

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Farmacia**

Departamento de Químico-Física II  
y  
Secc. Departamental de Química Analítica.

**Síntesis y caracterización de nuevas micropartículas  
poliméricas y su aplicación como sistemas de inmovilización  
enzimática en el diseño de biosensores amperométricos.**

---

Tesis realizada por:  
D. Jorge Rubio Retama

---

Dirigida por :  
Dra. Dña. Beatriz López Ruiz  
Dr. D. Enrique López Cabarcos

---

MADRID 2.005

## Resumen

El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdadera... ” *Albert Einstein* ”

## **Agradecimientos**

Este trabajo es sin lugar a dudas el texto más importante de cuantos he escrito. Durante su realización, han sufrido conmigo, compañeros, amigos, profesores y familiares, a los que ahora debo pedir disculpas y agradecerles toda su ayuda y comprensión.

# Índice general

<b>1. Introducción y Objetivos</b>	<b>1</b>
<b>2. Experimental</b>	<b>14</b>
2.1. Materiales . . . . .	14
2.1.1. Comerciales. . . . .	14
2.2. Materiales sintetizados en este trabajo . . . . .	15
2.3. Técnicas experimentales . . . . .	15
2.3.1. Microscopia de barrido, SEM. . . . .	15
2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido, DSC. . . . .	15
2.3.3. Difracción de rayos X. . . . .	16
2.3.4. Pontenciometría y voltamperometría cíclica. . . . .	16
2.3.5. Medidas de infrarrojos . . . . .	17
2.3.6. Espectroscopia fotónica de rayos X . . . . .	17
2.3.7. Dispersión de neutrones . . . . .	17
<b>3. Biosensores de Primera Generación</b>	<b>19</b>
3.1. Micropartículas poliacrílicas en el desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa. . . . .	19
3.1.1. Síntesis de las micropartículas de poli(acrilamida) . . . . .	19
3.1.2. Análisis estructural de las micropartículas de poli(acrilamida). . . . .	27
3.1.3. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli(acrilamida) . . . . .	42
3.1.4. Factores que influyen en la respuesta amperométrica del biosensor de glucosa . . . . .	45
3.1.5. Aplicación de los biosensores en sueros reales. . . . .	61
3.1.6. Estabilidad de los biosensores . . . . .	61
3.2. Micropartículas de poli(acrilato magnésico) en el desarrollo de biosen- sores amperométricos de glucosa biocompatibles. . . . .	63
3.2.1. Preparación del monómero, acrilato de magnesio (AMgA) . . . . .	63
3.2.2. Síntesis de micropartículas de poli(AMgA) . . . . .	63
3.2.3. Análisis estructural de las micropartículas de poli(AMgA). . . . .	65
3.2.4. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli(AMgA) . . . . .	71

3.2.5.	Influencia del grado de reticulación en la respuesta del biosensor compatible . . . . .	71
3.3.	Micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) en el desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa biocompatibles. . . . .	73
3.3.1.	Síntesis de poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	73
3.3.2.	Síntesis de las micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona). . . . .	74
3.3.3.	Análisis estructural de las micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	76
3.3.4.	Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	79
3.3.5.	Factores que influyen en la repuesta amperométrica del biosensor biocompatible de glucosa. . . . .	79
3.3.6.	Aplicación en la lectura de sueros. . . . .	85
3.3.7.	Estabilidad . . . . .	87
<b>4.</b>	<b>Biosensores de segunda generación</b>	<b>88</b>
4.1.	Micropartículas de poli(acrilamida)-polipirrol en el desarrollo de biosensores amperométricos. . . . .	88
4.1.1.	Preparación del polipirrol . . . . .	88
4.1.2.	Síntesis de las micropartículas de poli(acrilamida)-polipirrol, (PAPPy) . . . . .	89
4.1.3.	Análisis estructural de las micropartículas de PAPPy. . . . .	91
4.1.4.	Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de PAPPy . . . . .	96
4.1.5.	Factores que influyen en la respuesta amperométrica del biosensor. . . . .	96
4.1.6.	Aplicación de los biosensores. . . . .	103
4.1.7.	Estabilidad de los biosensores. . . . .	104
<b>5.</b>	<b>Biosensores de Tercera Generación</b>	<b>105</b>
5.1.	Diamante nano cristalino en el desarrollo de biosensores de 3 <sup>a</sup> generación . . . . .	105
5.1.1.	Desarrollo de electrodos de diamante nanocristalino, NCD . . . . .	105
5.1.2.	Inmovilización del enzima sobre la superficie de diamante. . . . .	106
5.1.3.	Desarrollo de biosensores de 3 <sup>a</sup> generación. . . . .	114
5.1.4.	Caracterización de los biosensores de 3 <sup>a</sup> generación. . . . .	115
5.1.5.	Estabilidad . . . . .	125
<b>6.</b>	<b>Estudio de la dinámica molecular en microgeles de poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAM, para su posible aplicación en biosensores</b>	<b>126</b>
6.1.	Movimientos moleculares en microgeles de PNIPAM . . . . .	126
6.1.1.	Preparación de los microgeles . . . . .	127
6.1.2.	Caracterización mediante dispersión de neutrones . . . . .	128
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>135</b>

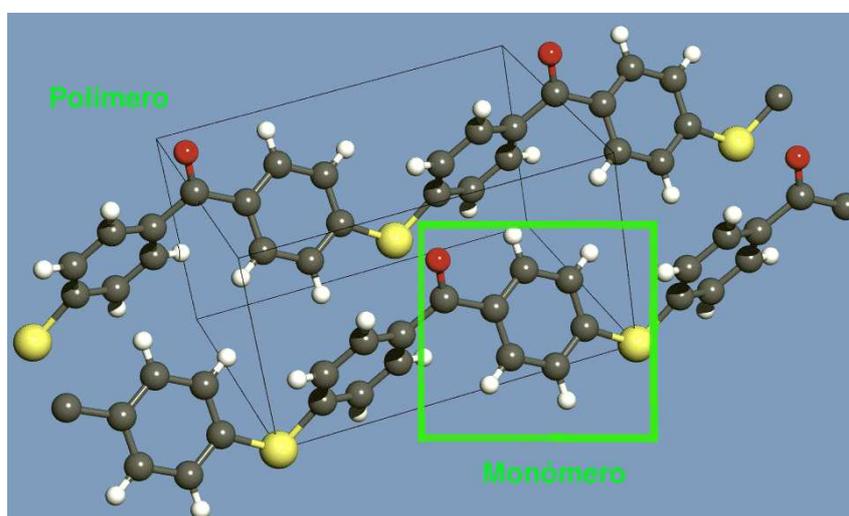
A. Abreviaturas	137
B. Trabajos publicados	139

# Capítulo 1

## Introducción y Objetivos

La Química de Polímeros es uno de los campos científicos de mayor desarrollo en la actualidad debido a sus aplicaciones y repercusión económica de las mismas. Estas macromoléculas están formadas por la repetición de monómeros, cuya naturaleza aporta al polímero propiedades físico-químicas diferentes. De esta forma, hoy en día es posible obtener polímeros rígidos, elásticos, aislantes térmicos, aislantes eléctricos, biocompatibles, biodegradables, liófilos e hidrófilos, etc. Hay que destacar, el gran interés que ha despertado la obtención de polímeros conductores por Heeger, Mc Diarmid y Shirakawa [1, 2] trabajo por el que recibieron el premio Nobel de Química en el año 2000. Consecuencia de este hallazgo es el reciente desarrollo de gran variedad de polímeros conductores, así como electrocromicos.

La amplia gama de propiedades que presentan los polímeros hace que sus aplicaciones sean de interés en campos tan diversos como industria farmacéutica, química, alimentaria, ingeniería, electrónica, materiales, etc [3, 4, 5, 6].



**Fig. 1** Estructura tridimensional de cadenas de poli(tio-eter-cetona).

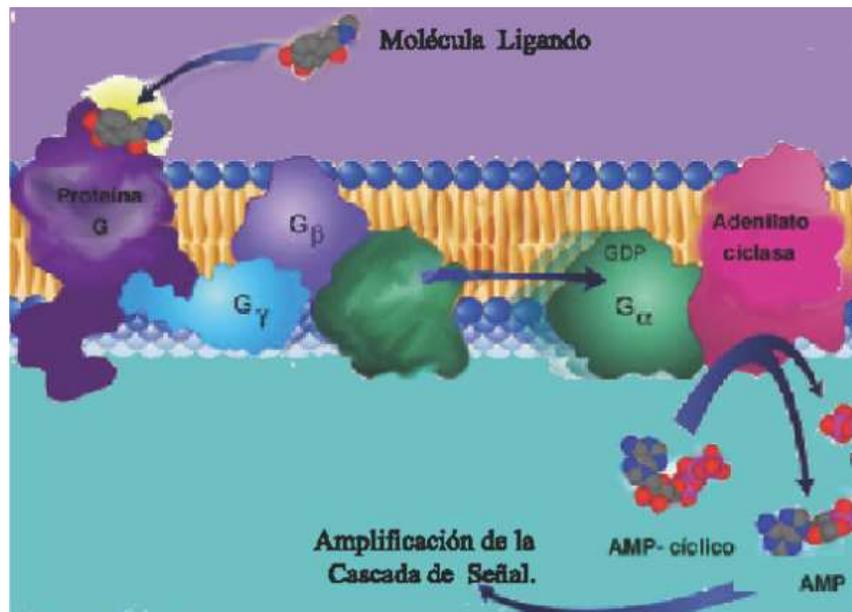
La mayor parte de las aplicaciones son derivadas del comportamiento físico-químico de estas macromoléculas, el cual está íntimamente relacionado con la estructura química y las interacciones existentes entre los monómeros. Como ejemplos

cabe mencionar el uso de polímeros con elevadas temperaturas de transición vítrea en la preparación de filtros para la purificación de humos industriales, lo que requiere que el polímero mantenga el tamaño del poro constante en un amplio rango de temperaturas. Otro ejemplo sería el aprovechamiento de la posibilidad de sintetizar polímeros cargados para emplearlos como sistemas de intercambios iónicos en la purificación de agua, donde son utilizados como quelantes de metales pesados [7, 8, 9, 10, 11]. La utilización de polímeros capaces de sufrir colapsos de volumen a ciertas temperaturas, como el PNIPAM, permitiría desarrollar sistemas inteligentes de liberación de fármacos, capaces de responder a cambios de temperatura corporal como la fiebre [12]. Un último ejemplo interesante sería el desarrollo de músculos artificiales en los que se utilizan polímeros conductores para su fabricación. Estos polímeros pueden participar en cambios de volumen, como respuesta al paso de una corriente eléctrica, lo que sirve para desarrollar trabajo [13, 14, 15]. Aunque los polímeros se emplean en gran cantidad de disciplinas científicas uno de los campos que mayores beneficios ha obtenido del desarrollo de los mismos, ha sido sin lugar a dudas, la Química Analítica. Aquí se han aprovechado las interacciones fisico-químicas, entre el polímero y el analito para desarrollar desde fases estacionarias que se aplican en columnas de separación cromatográficas, hasta polímeros capaces de reconocer moléculas específicas, utilizando huecos, generados en el polímero, en los que el analito encaja perfectamente [16, 17, 18, 79].

Otra parte importante de la Química de los Polímeros es la síntesis de micropartículas y nanopartículas coloidales [19, 20, 21], cuando se quiere aumentar la superficie específica del polímero. Esto da lugar a un incremento en la cinética de los procesos físico-químicos, mejorando considerablemente fenómenos difusivos, velocidades de reacción y/o cinéticas de hinchamiento o colapso.

Por ejemplo una aplicación interesante de estos sistemas ha sido la inmovilización de diferentes sustancias, como proteínas y enzimas en el interior. La inmovilización suele aportar estabilidad a la sustancia inmovilizada, debido fundamentalmente a las interacciones existentes entre el polímero y el enzima. Esto ha hecho posible el desarrollo de micro-reactores utilizados en la industria de biotransformaciones que se sirve de enzimas inmovilizadas, a las que el polímero aporta estabilidad frente a cambios de pH, temperatura, etc, al mismo tiempo que mantiene una cinética difusiva de la sustancia hacia el interior de la enzima apropiada [22, 23, 24]. La Química Analítica ha aprovechado las magníficas características que estos sistemas coloidales aportan para desarrollo de nuevos dispositivos analíticos específicos. En este sentido un problema de gran importancia es la selectividad, especialmente cuando se trabaja a concentraciones trazas y en presencia de sustancias interferentes. En este campo es necesario realizar análisis de medios complejos y determinar cantidades trazas lo que ha dado lugar a un considerable desarrollo de la instrumentación como se refleja en el avance de los modernos cromatógrafos de gases, espectroscopios de masas, espectroscopios de absorción atómica, etc. Sin embargo, el coste de estos aparatos y técnicas son elevados y además otra desventaja es que estos métodos analíticos no son susceptibles de ser utilizados sin un pretratamiento de las mues-

tras, lo que dificulta su manejo. Estos problemas han promovido el desarrollo de sensores químicos, mucho más manejables y baratos que los dispositivos anteriores. Aunque es posible encontrar sensores capaces de medir magnitudes físicas como temperatura, presión, etc, la determinación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos de interés biológico, resulta más difícil. Sensores electroquímicos de pH o electrodos de oxígeno tipo Clark son ampliamente utilizados. Sensores selectivos a iones y sensores potenciométricos son por otro lado particularmente interesantes para la determinación de iones pesados. Estos sensores químicos son escasamente aplicables a la determinación de compuestos de importancia fisiológica como la glucosa, el colesterol y la urea, siendo aun menos útiles para el análisis de enzimas, anticuerpos y microorganismos.



**Fig. 2** Representación esquemática del receptor de proteínas G.

Sin embargo los seres vivos si que son capaces de reconocer y adaptarse a las variaciones del metabolismo, utilizando para ello sistemas formados por receptores, como el complejo receptor-proteína G, tal y como se muestra en la figura 2. Estos receptores son en su mayoría estructuras complejas que se encuentran frecuentemente unidas a la membrana de la célula. El receptor posee gran afinidad por un ligando generalmente un transmisor de naturaleza proteica u hormonal y a consecuencia de la afinidad se produce una interacción específica entre ambos, que conlleva cambios estructurales en el receptor, iniciando una cascada de reacciones a través de las cuales la señal es amplificada. Cuando la señal ha sido transmitida, el complejo ligando receptor es degradado en el interior de la célula ocupando su espacio otro nuevo listo para actuar. La especificidad y sensibilidad de estos compuestos biológicos los hace sumamente atractivos para el desarrollo de sensores.

Una primera aproximación a la integración de sensores y componentes biológicos, se realizó empleando enzimas como herramientas analíticas. Así por ejemplo, para simplificar las medidas enzimáticas de glucosa, Free y col., (1956) [25] adoptaron el

principio del papel tornasol usado en las medidas de pH. Este papel era impregnado de enzimas glucosídicas. Tras la reacción del enzima con la glucosa los productos provocaban un cambio de color de las tiras del papel, dando como resultado el primer sensor óptico, predecesor de los modernos biosensores optoelectrónicos.

Hoy en día es fácil encontrar complejos test en tiras reactivas capaces de determinar no sólo metabolitos de bajo peso molecular sino también enzimas, anticuerpos y/o antígenos.

En una primera etapa del desarrollo de los biosensores, las determinaciones de algunos compuestos orgánicos eran realizadas midiendo la variación de algún elemento mediante un electrodo selectivo depositado en el medio en el que se producía la reacción enzimática. Así, por ejemplo, las determinaciones de glucosa eran llevadas a cabo monitorizando el consumo de  $O_2$  en una solución de glucosa en la que se disolvía glucosa oxidasa. Rápidamente algunos investigadores como Clark y Lion, inventores del detector de oxígeno (tipo Clark), inmovilizaron el enzima cerca del electrodo y lo fijaron mecánicamente mediante una membrana semipermeable que evitaba la mezcla del enzima en la solución. De esta forma una sola preparación de solución enzimática podía ser utilizada para el estudio de diferentes muestras. Este tipo de diseño estableció el concepto del biosensor, que se caracteriza fundamentalmente por la combinación de material biológico unido al transductor. El componente biológico, ADN, ARN, proteína, enzima, anticuerpos, etc, reconoce de forma específica el compuesto de interés, generando una señal cuantificable como resultado de su unión al analito. Desde entonces, el campo de los biosensores ha avanzado rápidamente como así lo revela, no sólo el gran número de artículos relacionados con estos dispositivos, sino también el dinero invertido por administraciones tanto públicas como privadas para su desarrollo y aplicación [26]. Recientes estudios establecen que el mercado actual de investigación, desarrollo y venta de biosensores mueve alrededor de 7 billones de euros al año [27] en el mundo.

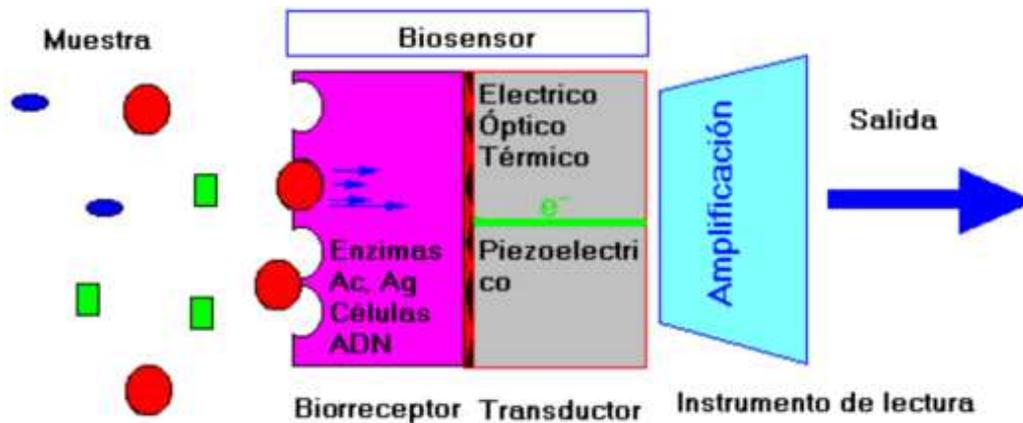


**Fig. 3** Fotografía de un glucometer, biosensor sensible a glucosa y cetona ampliamente extendido en la monitorización de la glucemia.

El desarrollo de este tipo de dispositivos ha sido impulsado fundamentalmente por el campo de la salud. Aquí, la necesidad de un diagnóstico y tratamiento rápido, se considera un aspecto muy importante dentro de la medicina. Por este motivo es necesario tener sistemas analíticos altamente selectivos y sensibles así como baratos, que puedan ser utilizados tanto en el diagnóstico como en la monitorización farmacológica. En este punto cabe resaltar la gran utilidad que los biosensores prestan en las auto-determinaciones de glucosa en pacientes diabéticos, esta enfermedad que comienza a tener características de pandemia en la sociedad actual ha impulsado el desarrollo de biosensores sensibles a glucosa, representando éstos el 85 % del mercado de biosensores comercializados [27].

Sin embargo, la aplicación de biosensores no sólo se encuentra limitada al campo de la salud. En la actualidad las ciencias del medioambiente están aprovechando la capacidad analítica y sencillez de estos dispositivos para detectar contaminación por pesticidas, metales pesados, así como por compuestos orgánicos volátiles en aguas subterráneas, ríos y lagos [28, 29, 30]. También en nutrición se emplean biosensores en análisis de calidad de productos y pureza de los mismos [31, 32, 33].

En los biosensores los componentes biológicos están acoplados a un transductor, éste se encarga de transformar la señal química generada por la interacción entre el componente biológico y la molécula diana, en una señal eléctrica fácilmente cuantificable.



**Fig. 4** Esquema general de un biosensor.

En función de la naturaleza de la señal química generada, que depende en gran medida del componente biológico empleado, se utilizan diversos tipos de transductores, lo que ha dado lugar a una clasificación de los biosensores en:

**Biosensores ópticos:** Basados en medidas de luz absorbida o emitida por un compuesto que es consumido o producido como consecuencia de la interacción entre el componente biológico y el analito. En este tipo de biosensores, la radiación electromagnética puede viajar a través de fibra óptica hasta el detector, normalmente un espectroscopio [34, 35, 36].

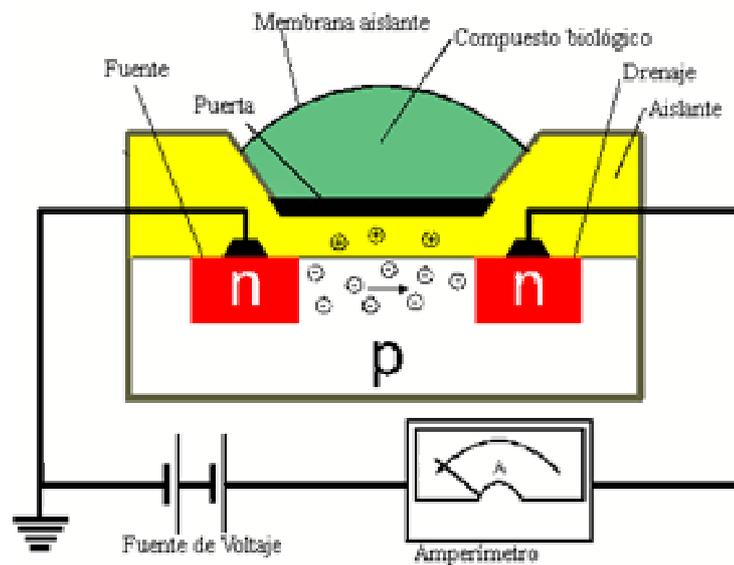
**Biosensores calorimétricos:** Basados en la medida de la variación de la entalpía provocada durante la interacción entre el componente biológico y la molécula diana. [37, 38].

**Biosensores piezoeléctricos:** Basados en el principio de generación de dipolos eléctricos en cristales anisótropos como consecuencia de un estrés mecánico. En este tipo de dispositivos la señal medida por el transductor es la alteración de la frecuencia de oscilación resultado de la adsorción del analito en el soporte, generalmente cristales de cuarzo en los que se suele depositar anticuerpos, antígenos o cadenas de ADN o ARN, que reaccionan de forma específica con el analito complementario [39, 40].

**Biosensores potenciométricos:** Estos dispositivos se basan en la medida de la diferencia de potencial eléctrico entre dos disoluciones separadas por una membrana semipermeable. Dicha diferencia de potencial está relacionada con la concentración de la sustancia a la que la membrana es semipermeable mediante la ecuación de Nerst.

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \times \ln(a_s) \quad (1.1)$$

Un ejemplo de dispositivos basados en este principio son los pH-metros. Estos sistemas han servido de base para desarrollar biosensores cuyas enzimas generan especies capaces de cambiar el pH local del medio, variación que puede relacionarse con la concentración de la especie de interés [41].



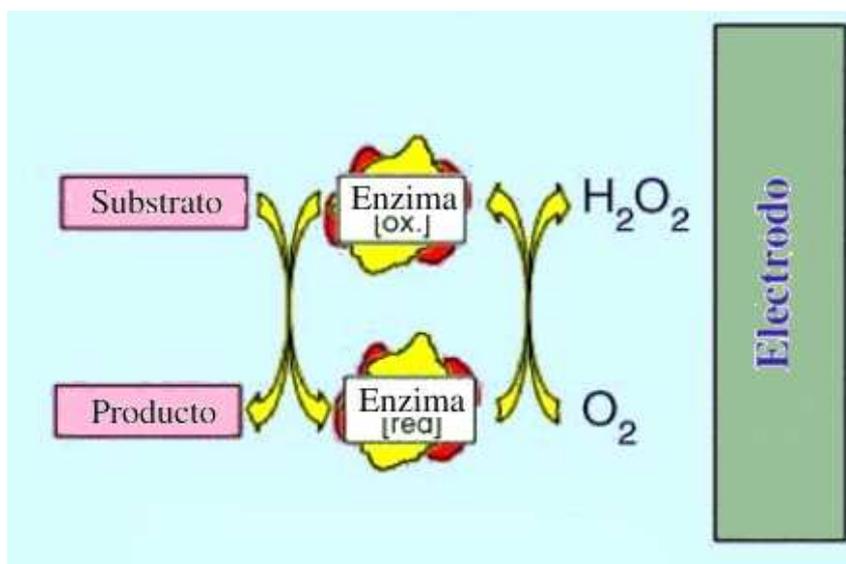
**Fig. 5** Esquema de un biosensor potenciométrico tipo ISFET.

En los últimos años ha surgido un nuevo tipo de biosensores potenciométricos basado en el fenómeno de campo en transistores selectivos a iones "ISFET" [42, 43]. Esta nueva tecnología, puede ser integrada en sistemas electrónicos tales como chips [44], cualidad que abre las puertas a una integración bio-electrónica, con una aplicación

directa en la implantación de órganos mecánicos conectados a nervios mediante terminales que funcionan con este tipo de sistemas .

**Biosensores Amperométricos:** Estos dispositivos forman el grupo más amplio y al mismo tiempo, el más utilizado por su sencillez y sobre todo por el bajo coste de los dispositivos empleados para su fabricación. En este tipo de biosensores se emplean enzimas oxidorreductoras como material biológico. Estas enzimas son muy abundantes en la naturaleza por lo que es fácil encontrar una que catalice una reacción de forma selectiva con un compuesto de interés. Esta selectividad ha hecho posible la aparición de biosensores amperométricos capaces de determinar glucosa, lactato, etanol, acetil colina, colesterol, ácido úrico, etc, sustancias todas ellas interesantes desde el punto de vista clínico.

El mecanismo de acción de estos biosensores está basado en la generación de una corriente eléctrica resultado de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en la superficie del electrodo. Generalmente el analito de interés mantiene una relación de proporcionalidad con la molécula electro-activa en un rango lineal que se encuentra a concentraciones inferiores a las de saturación del enzima. En estos biosensores, la especie electro-activa comunica el electrodo y el enzima, estableciendo entre ellos un transporte de electrones. Este tipo de transporte ha dado lugar a la denominada "primera generación" de biosensores. El esquema mostrado en la figura 6 representa el modelo clásico en el que se basa la detección en los biosensores de primera generación. Un ejemplo modelo de este tipo de detección lo constituyen los biosensores de glucosa, en los que se emplea glucosa oxidasa como componente biológico.



**Fig. 6** Esquema de un biosensor de primera generación basado en la oxidación de un sustrato y formación de  $H_2O_2$ .

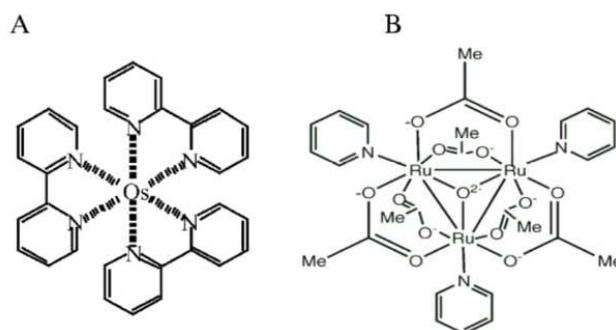
El producto de la reacción,  $H_2O_2$ , constituye la especie electroactiva cuya oxidación en el electrodo a potenciales  $\sim +0,6V$  vs.  $Ag/AgCl$  genera una corriente proporcional

a la concentración de  $H_2O_2$  en el medio. Además la concentración de  $H_2O_2$  está relacionada con la concentración del sustrato mediante la ecuación de Michaelis Menten;

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

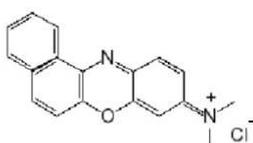
Esta ecuación establece una relación proporcional entre el producto y el sustrato de la reacción cuando el valor de  $[S]$  es inferior a la  $K_m$  [45].

Este primer grupo de biosensores amperométricos presentan el inconveniente de utilizar grandes potenciales de lectura, lo que amplía el abanico de posibles interferentes electro-activos que pueden interferir en la medida, disminuyendo la selectividad de los dispositivos. Por ello se han diseñado otro tipo de dispositivos, denominados "biosensores de segunda generación" en los que se han intentado reducir estos problemas mediante la sustitución del producto de la reacción por un mediador cuyo potencial de oxido-reducción se encuentra cerca de 0V vs. Ag/AgCl. Esta molécula está encargada de conectar eléctricamente el enzima con la superficie del electrodo. Entre las moléculas utilizadas caben destacar complejos con metales inorgánicos de osmio, rutenio e hierro (figura 7), muy utilizados como puede observarse en la bibliografía [46, 47, 48] y otros de origen orgánico como el meldola azul (figura 8), metil-viológeno, tetratiofulvaleno, etc [49].



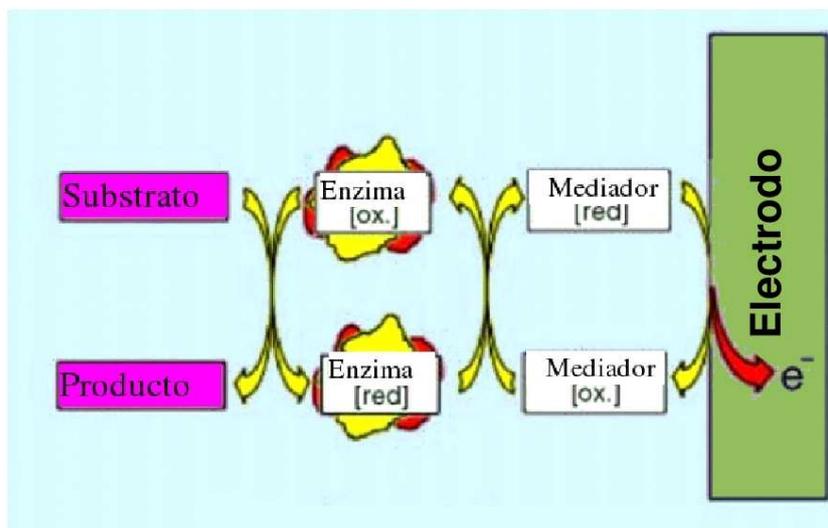
**Fig. 7** Estructura química de; A) complejo de osmio y B) complejo de rutenio.

Todos estos mediadores tienen la propiedad de oxidarse y reducirse a potenciales cercanos a 0V vs. Ag/AgCl. Además los picos de oxidación y reducción en estas moléculas se encuentran muy próximos, dando lugar a procesos rédox reversibles que aumentan la eficacia del transporte de electrones.



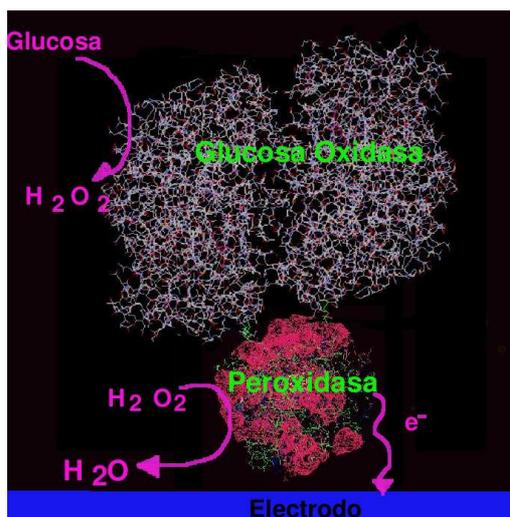
**Fig. 8** Estructura química del meldola azul.

Al introducir estos mediadores en el biosensor es posible reducir los potenciales de lectura de los mismos disminuyendo así el número de sustancias interferentes que pueden ser oxidadas o reducidas de forma indiscriminada, incrementando por tanto, la selectividad de estos dispositivos.



**Fig. 9** Esquema de un biosensor de segunda generación basado en la transferencia de electrones utilizando un mediador rédox.

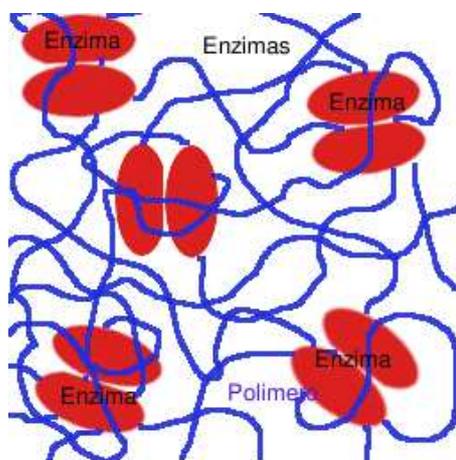
Uno de los últimos avances en el campo de los biosensores amperométricos ha sido la utilización del fenómeno de transferencia directa de electrones, "efecto túnel", para comunicar eléctricamente el enzima con el electrodo. Este fenómeno se produce cuando entre dos puntos separados a distancias  $\sim 50\text{\AA}$ , existe una pequeña diferencia de potencial. Este proceso aplicado a electrodos, en los que se ha inmovilizado enzimas, como las pertenecientes al grupo hemo, citocromo P450, peroxidasa, catalasas, etc, ha dado como resultado el desarrollo de los "biosensores de tercera generación". Este tipo de biosensores se caracteriza por que realizan la transferencia de electrones entre el enzima y la superficie del electrodo a potenciales cercanos a 0V vs. Ag/AgCl sin la mediación de moléculas intermediarias, factor que incrementa notablemente la sensibilidad y selectividad de los biosensores resultantes, reduciendo aun más el número de moléculas interferentes [50, 51].



**Fig. 10** Esquema de transferencia electrónica mediada por el efecto túnel entre el enzima y la superficie de un electrodo.

Sin embargo y debido a los parámetros específicos en los que tiene lugar el efecto túnel entre el centro catalítico y el electrodo, se reduce considerablemente el número de enzimas que pueden emplearse en este tipo de diseño, y como consecuencia, el número de sustancias que son susceptibles de ser analizadas. Este inconveniente puede ser solucionado acoplando una segunda enzima en el electrodo de trabajo. Ésto permite construir biosensores bienzimáticos en los que el producto generado por un enzima más común, como la colina oxidasa, galactosa oxidasa, etc, es el sustrato de la enzima susceptible de sufrir fenómeno túnel (figura 10). El resultado son biosensores altamente selectivos, con los que es posible determinar gran cantidad de sustancias diferentes.

Esta clasificación, producto tal vez de la evolución de este campo, puede dar la falsa sensación de que en la actualidad se está muy cerca de obtener un sistema altamente selectivo y con una sensibilidad sin precedentes. Sin embargo, la realidad es otra bien distinta, ya que existen problemas relacionados con las características analíticas que harían necesario un esfuerzo para solucionarlos. Uno de los mayores problemas lo encontramos en la estabilidad del componente biológico utilizado en el diseño de los biosensores. En el organismo, la mayoría de los componentes biológicos son regenerados tras realizar su función. Por el contrario, la imposibilidad actual de regenerar el componente biológico en el biosensor, hace necesario incrementar su estabilidad para aumentar la vida útil del dispositivo. Salvo en aquellos biosensores diseñados como desechables, en general la estabilidad del material biológico se ha incrementado inmovilizando dicho componente en diferentes soportes. Entre estos métodos hay que destacar el atrapamiento en geles poliméricos.



**Fig. 11** Esquema de inmovilización enzimática de un enzima dentro de una red de polímero.

De esta forma se consigue un aumento en la estabilidad del material biológico como consecuencia del incremento de la rigidez estructural de la cadena proteica, debido a que se forma una red que engloba y atrapa a la proteína en unos huecos internos cuyo tamaño depende del grado de reticulación del polímero. Los huecos hacen que la red polimérica tenga una estructura porosa en la que se pueden inmovilizar sustancias con diámetros superiores al tamaño de dichos poros, permitiendo el flujo de moléculas de menor tamaño. Estas propiedades benefician las características

analíticas por proteger el enzima sin ser aislada del medio. Al inmovilizar el enzima en la matriz polimérica no sólo quedan restringidos los movimientos de las cadenas peptídicas sino que también el microambiente existente dentro de la matriz protege al enzima de cambios bruscos del pH, realizando una estabilización tanto química como física. La figura 11, muestra un esquema de inmovilización de enzimas en una matriz polimérica.

Esta estabilización no se puede entender sin la existencia de interacciones físico-químicas entre el enzima y el polímero, tales como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc, que dan como resultado modificaciones tanto en el comportamiento catalítico del enzima como en las propiedades físicas del polímero.

Inicialmente la inmovilización en membranas poliméricas realizadas por Updike y Hicks, y más recientemente por Ramanathan y Chaubey, [52, 53] presentan problemas relacionados con la lenta cinética de difusión de las sustancias hacia el interior de la matriz polimérica lo que ralentiza el tiempo de respuesta de los dispositivos preparados [55, 56]. Debido a esto se comenzaron a desarrollar métodos con los que poder preparar membranas poliméricas cada vez más finas. Así se ha conseguido una disminución de la barrera difusional lo que ha mejorado los tiempos de respuesta. Sin embargo, la fragilidad de las membranas ha empeorado la robustez y dificultado la manipulación del componente biológico.

Una de las posibles soluciones consiste en el atrapamiento dentro de sistemas coloidales. Estos sistemas pueden mejorar las cinéticas difusivas del analito y la manipulación del material biológico, incrementando la robustez del dispositivo resultante. Además, y como consecuencia de su reducido tamaño, estos sistemas de inmovilización permitirían el desarrollo de biosensores miniaturizados, lo que amplía enormemente las aplicaciones por mejorar el transporte de los dispositivos.

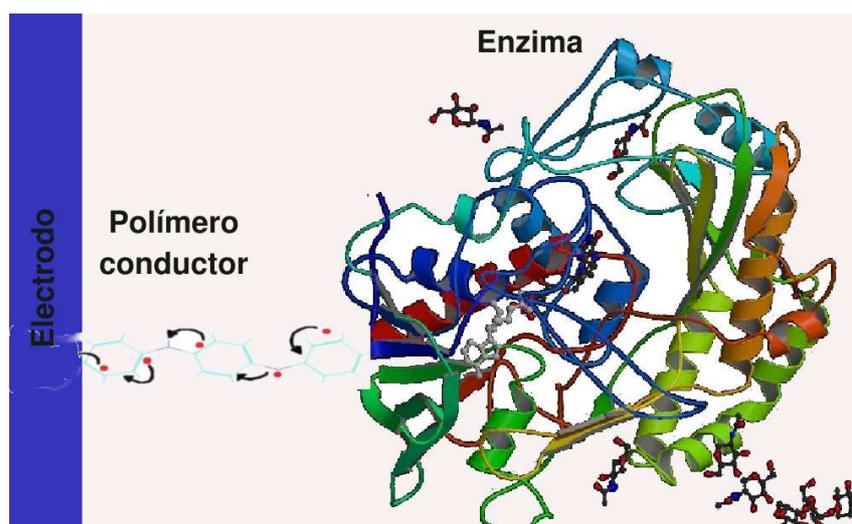
Como alternativa al empleo de membranas poliméricas como soporte del componente biológico en el diseño de biosensores amperométricos, en esta Tesis se presenta como primer objetivo el desarrollo de un nuevo sistema de inmovilización de enzimas en el interior de microgeles poliacrílicos. La enzima seleccionada para realizar la inmovilización es la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*. Sobre este sistema se estudiará la influencia de los parámetros de la síntesis en el comportamiento físico-químico del polímero así como del enzima inmovilizado. Las micropartículas con enzimas serán empleadas en el desarrollo de componentes biológicos en biosensores amperométricos sensibles a glucosa.

Una de las cualidades más interesantes de los biosensores ha sido su capacidad para ser utilizado en medidas *in vivo*, lo que ha fomentado el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles que puedan ser utilizados en el diseño de biosensores susceptibles de ser implantados en organismos [57, 58]. Por este motivo, gran parte de la investigación en el diseño de nuevos biosensores ha buscado materiales biocompatibles en los que poder inmovilizar el material biológico [59, 60].

Por ello en este trabajo se ha propuesto como segundo objetivo sintetizar micropartículas poliméricas biocompatibles en las que se ha inmovilizado glucosa oxi-

dasa de *Aspergillus niger*. El conjunto ha sido empleado como componente biológico formando parte de un biosensor amperométrico biocompatible sensible a glucosa y susceptible de ser implantado en organismos vivos.

En el campo de la investigación de nuevos materiales cabe destacar el gran número de artículos referentes al desarrollo de biosensores en los que utilizan polímeros conductores, tanto para inmovilizar el enzima en su interior como para mejorar el transporte de electrones entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo [61, 62, 63, 64]. Estos polímeros, formados por monómeros con estructura resonante, tienen la capacidad de transportar los electrones utilizando el sistema de dobles enlaces  $\pi$  deslocalizados. Esta propiedad inherente a su estructura permite "conectar" eléctricamente el centro activo del enzima con la superficie del electrodo, actuando como un mediador en el transporte electrónico. Estos polímeros llevan asociado la ventaja de su conductividad eléctrica y poder emplear menores potenciales de lectura. Además, al ser transportados los electrones vía polímero conductor, el tiempo de lectura del biosensor disminuye ya que el producto electro-activo no tiene que difundir hacia el electrodo. Estas propiedades hacen que se puedan obtener biosensores altamente sensibles, selectivos y de rápida respuesta.



**Fig. 12** Representación esquemática de la conexión eléctrica entre el enzima y la superficie del electrodo realizada por una cadena de polímero conductor.

Aunque existe gran cantidad de trabajo al respecto, en la mayoría se hace referencia a la utilización de polímeros electropolimerizados. En esta Tesis se propone como tercer objetivo el empleo de micropartículas conductoras de poli(acrilamida)-polipirrol, en las que el enzima inmovilizada queda eléctricamente conectada con el electrodo.

Con ello es posible obtener biosensores de segunda generación. Esta modificación permite además diseñar micro-biosensores en Donde el electrodo estaría formado por una micropartícula conductora.

El desarrollo actual de los biosensores amperométricos pasa por su integración en microchips. En este campo la investigación se centra en obtener materiales electródicos baratos, estables, con amplio potencial de lectura, químicamente modificables y biocompatibles. Estas necesidades no cubiertas por materiales como oro, platino, carbón vitrificado, etc, podrían ser satisfechas por un nuevo material, el diamante nanocristalino, el cual está siendo aplicado en áreas como la de los semiconductores, debido a sus excepcionales propiedades eléctricas, entre las que cabe destacar la capacidad de ser dopado con dopantes tipo n o tipo p. Además su estabilidad tanto química como física permite trabajar en un amplio rango de potencial eléctrico sin alteraciones. Junto a estas propiedades, su inherente biocompatibilidad, hacen del diamante nanocristalino una de las mejores opciones en el desarrollo de materiales electródicos. Como cuarto objetivo, en esta Tesis se presenta por primera vez, un biosensor de tercera generación, sensible a peróxido de hidrógeno, en el que se utiliza diamante nanocristalino como componente electródico.

Las micropartículas de poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAM, presenta una transición de volumen en la cual el microgel colapsa y disminuye sus dimensiones aproximadamente a un tercio de su valor inicial. Esta transición se puede disparar con pequeños cambios de temperatura, pH, composición del disolvente, fuerza iónica, campo eléctrico, etc.

Se ha especulado con la posibilidad de preparar microgeles que colapsen o se hinchen en situaciones prefijadas y utilizar estas propiedades para liberar sustancias o preparar sensores. Por ejemplo, crear un páncreas artificial que liberara insulina (hinchamiento del gel) cuando el nivel de glucosa descendiese, o aprovechar el cambio de volumen para crear un sensor térmico o de pH. Como quinto objetivo de esta Tesis hemos sintetizado y estudiado la estructura y la dinámica molecular de microgeles de PNIPAM con vistas a explorar la aplicación de la transición de volumen en biosensores.

# Capítulo 2

## Experimental

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Comerciales.

En la preparación de las emulsiones concentradas se han empleado productos comerciales de alta pureza como dodecano (Sigma) para obtener fases oleosas y Span 80 (Fluka) utilizado como emulsificante. Los monómeros hidrosolubles utilizados para la polimerización de la fase acuosa de las emulsiones concentradas fueron acrilamida (AM) Sigma, ácido acrílico (AA) de Fluka y NN'metilen-bis-acrilamida (BIS) de Aldrich que se usó como agente reticulante. Estos monómeros fueron polimerizados utilizando como agente iniciador persulfato de amonio (PAS) de Fluka y NN tetrametil-etilen-diamina (TEMED) de Fluka como agente catalizador.

En el caso de la preparación de nanopartículas, el monómero utilizado fue el N-isopropil-acrilamida (NIPAM) de Sigma reticulado con BIS y polimerizado con PAS como agente oxidante.

Para la síntesis del polímero conductor disperso en agua se utilizó pirrol (Py) de Fluka como monómero y poliestirensulfonato (PSS) de Sigma como estabilizante. Para polimerizar el Py se empleo como agente oxidante PAS.

La síntesis de la poli( $\epsilon$ -caprolactona)(PCL) fue realizada utilizando  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ CL) de Sigma como monómero, alcohol bencílico (BnzOH) de Sigma como iniciador de la cadena y como catalizador trifloro-metil-sulfonato de Sn <sup>II</sup> (OctSn) de Sigma.

La enzima elegida para ser encapsulada dentro de las micropartículas es la Glucosa Oxidasa de *Aspergillus niger* (GOx), en tanto que la enzima utilizada en los biosensores de 3<sup>a</sup> generación es la peroxidasa de *Horse radish*(HRP). Para determinar las actividades enzimáticas se utilizó glucosa (Merk) como sustrato de la reacción enzimática de la GOx , así como  $H_2O_2$  de Fluka para la HRP.

## 2.2. Materiales sintetizados en este trabajo

Una parte muy importante de este trabajo de Tesis la constituye la síntesis de nuevos materiales realizada íntegramente en nuestro laboratorio. Como los materiales para los biosensores de primera, segunda y tercera generación son muy distintos en cada capítulo se detalla la síntesis del material correspondiente. Es más, para los biosensores de tercera generación se propone la utilización de diamante nanocristalino. Aunque ya existe un laboratorio donde se fabrica nanopartículas de NCD, para este trabajo no hemos podido acceder a esta tecnología cara y altamente sofisticada, optando por preparar los biosensores de tercera generación sobre superficies de NCD.

## 2.3. Técnicas experimentales

### 2.3.1. Microscopia de barrido, SEM.

El análisis de la morfología y tamaño de la partícula en estado sólido se ha realizado con un microscopio de barrido de marca JOEL, modelo JSM-6400, operando a 20KV. Se han realizado microfotografías desde 1500 a 6000 aumentos. Las muestras se preparan depositando una pequeña cantidad sobre un porta que posteriormente es cubierto con una fina lámina de oro. Este recubrimiento es realizado en un Sputter Coater marca Balzers, modelo SCD 004.

Además este aparato está dotado de un analizador de elementos. Dicho analizador está basado en la medida de la energía de los fotones emitidos por los electrones de las capas más internas del átomo. Dichos electrones son excitados por los electrones incidentes del haz del microscopio liberando un fotón al volver el electrón excitado a su nivel basal. La energía del fotón liberado es por tanto específica del átomo excitado, lo que permite por lo tanto realizar un análisis cualitativo y semicuantitativo de la muestra.

### 2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido, DSC.

Las medidas de calorimetría se realizan utilizando un calorímetro diferencial programado Mettler modelo 821e. El aparato está conectado a un sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido, con el que se puede medir en un intervalo de temperatura comprendido entre  $-150^{\circ}\text{C}$  y  $700^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Las medidas de entalpía de sustancias puras pueden tener un error de medida de  $\pm 1\%$ . Este DSC está provisto de un sensor de cerámica con dos termopares de oro y platino. El horno del DSC es de plata y su diseño permite conexiones de purga de gas a  $10\text{mL}/\text{min}$ . La calibración del DSC se efectúa periódicamente, comprobando que la temperatura y entalpía de fusión del indio puro coincide con los valores tabulados. Para la temperatura se admite una desviación máxima de  $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$  respecto del valor teórico ( $156,6^{\circ}\text{C}$ ) y para el calor de fusión se admite una desviación máxima de  $\pm 0,5\%$  del valor teórico ( $28,45\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Si los valores se desvían más de lo admitido se procede a la calibración de la entalpía con indio y de la temperatura con indio y zinc. Cuando se esperan obtener

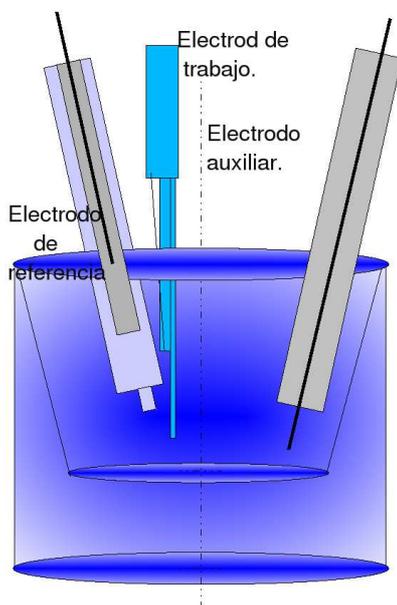
picos a temperaturas de  $-50^{\circ}\text{C}$  se toman como patrones de calibración los parámetros térmicos del mercurio ( $-38,8^{\circ}\text{C}$  y  $11,4 \text{ J.g}^{-1}$ ) o del hexano ( $-94^{\circ}\text{C}$  y  $151,8 \text{ J.g}^{-1}$ ) dependiendo del intervalo de temperaturas en el que se vaya a trabajar. Todas las muestras analizadas tienen un peso aproximado de 5 mg.

### 2.3.3. Difracción de rayos X.

Las medidas de rayos X se han realizado en un difractómetro Philips X'Pert modelo PW3050. Los difractogramas se registraron cubriendo un intervalo angular entre  $2\theta = 1,5^{\circ}$  y  $2\theta = 35^{\circ}$ , registrando  $0,01^{\circ}$  cada segundo. El método de adquisición de los difratogramas es por reflexión con un error estimado en la posición de las reflexiones de  $0,2^{\circ}$ . Para calibrar la distancia a la película se ha utilizado polvo de silicio. La temperatura de las muestras medidas presenta una precisión de  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.4. Pontenciometría y voltamperometría cíclica.

Para realizar las medidas amperométricas utilizamos un potenciostato de la casa Metrohm modelo E-506, operando a un potencial variable según el tipo de biosensor. Este potenciostato está conectado a una celda electroquímica de 10mL de capacidad conectada a su vez a un baño termostatizado. La celda cuenta con tres electrodos: un electrodo de referencia de calomelanos saturado (SCE), un electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo que es el biosensor. La figura 13 muestra el esquema de la celda electroquímica utilizada para realizar las medidas.



**Fig. 13** Celda electroquímica utilizada en las medidas.

Antes de utilizar el potenciostato es conveniente recargar el electrodo de referencia con una solución saturada de cloruro potásico. Además es necesario regenerar los electrodos de platino tanto el de trabajo como el auxiliar. Para esto son pulidos con

alúmina de  $1\mu\text{m}$  y  $0,1\mu\text{m}$  y a continuación son sonicados y lavados con abundante agua. Después son regenerados sometiendo a potenciales alternos de  $-2\text{V}$  y  $+2\text{V}$  vs (ESC) durante un período de 30 segundos, repitiendo este último paso 10 veces.

### 2.3.5. Medidas de infrarrojos

Las medidas de infrarrojos se realizaron utilizando un espectrofotómetro infrarrojo de la casa Beckman Acculab. Las pastillas de bromuro potásico analizadas tenían en todos los casos una riqueza que oscilaba entre el 2% y el 5% en peso de muestra.

### 2.3.6. Espectroscopia fotónica de rayos X

Para realizar las medidas de espectroscopia electro-fotónica de rayos X se empleó una fuente de rayos X del tipo SPECS RQ 20/38 con dos ánodos gemelos de Al/Mg. La energía de los electrones fue medida con un analizador semiesférico SPECS EA 10.

### 2.3.7. Dispersión de neutrones

Parte del estudio estructural de los microgeles ha sido realizado mediante difracción de neutrones. Estos estudios fueron realizados en la cámara de ángulos bajos KSW1 instalada en el Kernforschungszentrum (Jülich, Alemania) cubriendo el intervalo de  $q$  comprendido entre  $5 \times 10^{-3} \text{Å}^{-1}$  y  $0,5 \text{Å}^{-1}$ . Esta técnica permite estudiar como se acomodan las cadenas de polímero y como se ven afectadas al variar algunos parámetros estructurales que afecten a la red polimérica de las micropartículas. La técnica de difracción a bajo ángulo es idónea para el estudio en un amplio rango de distancias en las que se puede observar el comportamiento del polímero, gracias a la diferente sección eficaz de dispersión existente entre los hidrógenos del polímero y el deuterio del  $D_2O$ . En soluciones semidiluidas la estructura de los geles se caracteriza por la distancia de correlación  $\xi$ , la cual está definida como la distancia característica entre regiones donde existen fluctuaciones en la concentración de polímero. La función de correlación  $\xi$  está definido por;

$$\langle \phi(0)\phi(r) \rangle = (1/r)^{(-r/\xi)} \text{ para } r > \xi \quad (2.1)$$

Siendo  $r$  el módulo del vector de posición. En estas condiciones la distancia referida a  $\xi$  puede visualizarse como una escala de distancias superior a la que el sistema se puede considerar como homogénea. Sin embargo cuando  $q\xi < 1$  la distancia observada se corresponde con una sólo cadena y la función de correlación viene dada por:

$$\langle \phi(0)\phi(r) \rangle \sim r^{-4/3} \text{ para } r < \xi \quad (2.2)$$

En los experimentos de dispersión de neutrones a bajo ángulo se mide la intensidad dispersada  $I(q)$  en función del vector de dispersión  $q = (4\pi/\lambda) \times \sin(\theta/2)$ .

Esta intensidad es proporcional a la transformada de Fourier de la ecuación 2.1 cuando  $q\xi > 1$ . En estas condiciones la función resultante es del tipo de Ornstein-Zernike.

$$I(q) = I_L(0)/(1 + q^2\xi^2) \quad (2.3)$$

En esta expresión,  $I_L(0)$  se identifica como la intensidad de dispersión de un gel ideal. Para  $q\xi < 1$ ,  $I(q)$  está dada por;

$$I(q) \sim q^{-1/\nu} \quad (2.4)$$

Esta expresión es similar para la ley de dispersión de dimensiones fractales  $d_F = 1/\nu$ . Cuando se introducen entrecruzamientos en las cadenas de polímero, el sistema se complica no existiendo una solución que describa la difracción de estos geles. La intensidad a bajo  $q$  en el registro de dispersión se aproxima a una exponencial ampliada [81, 82], y para geles entrecruzados la intensidad total está constituida por dos o más contribuciones independientes [115].

$$I(q) = I_G(0)\exp(-(q\Lambda)^p) + I_L(0)/(1 + q^2\xi^2) \quad (2.5)$$

Donde  $I_G(0)$  representa la contribución producida por las fluctuaciones estáticas relacionadas con las heterogeneidades del entrecruzamiento. En el caso de los ultra-microgeles el factor de la forma no puede ser obviado [65, 66]. Por ello a muy bajo ángulo debe introducirse otro factor que contiene un término adicional causado por la superficie de la partícula,  $I(q) \sim q^{-4}$  para interfaces difuminadas.

# Capítulo 3

## Biosensores de Primera Generación

### 3.1. Micropartículas poliacrílicas en el desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa.

Se han desarrollado biosensores de primera generación utilizando como material biológico micropartículas de poli(acrilamida) con GOx inmovilizada en su interior. Con esto se intenta poner a punto un sistema de inmovilización basado en el atrapamiento del enzima en micropartículas de polímero.

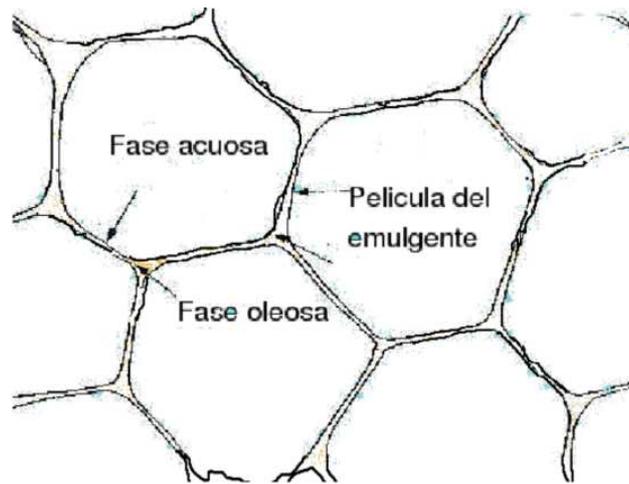
#### 3.1.1. Síntesis de las micropartículas de poli(acrilamida)

En este trabajo se han preparado micropartículas por polimerización desde emulsiones concentradas w/o, siguiendo el método descrito por Ruckenstein y col [67]. Este tipo de emulsiones se caracterizan por tener una fracción de volumen interna  $\rho > 0,75$  siendo  $\rho$ :

$$\rho = \frac{V_{interna}}{V_{interna} + V_{externa}} \quad (3.1)$$

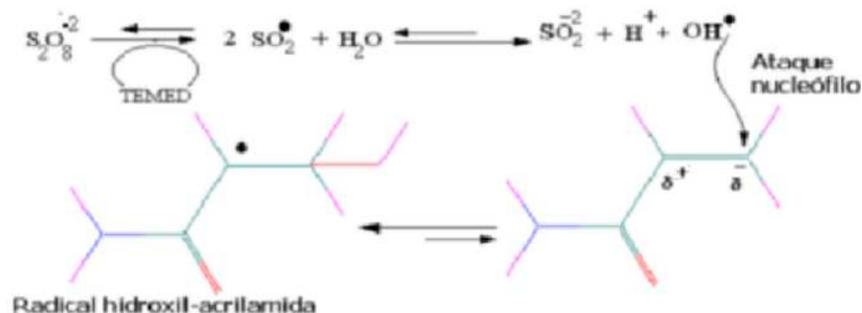
Donde  $V_{interna}$  es el volumen de la fase interna acuosa de la emulsión y  $V_{externa}$  es el volumen de la fase externa de la emulsión. Debido a la gran proporción de fase interna con respecto a la fase externa, la emulsión adquiere una estructura especial en forma de *panel de abeja*, donde la fase externa oleosa recubre mediante un capa delgada a la fase interna dispersada en ella. Las emulsiones preparadas en este trabajo tienen  $\rho \geq 0,86$ . Para estabilizar estas emulsiones se ha empleado Span 80 (monooleato de sorbitol) que tiene un coeficiente hidrofilia-lipofilia (HLB) de 4,3. El Span 80 se solubiliza en la fase oleosa la cual constituirá la fase externa. Para formar la emulsión concentrada se utiliza un reactor de tres bocas provisto de agitación magnética. La formación de la emulsión concentrada se realiza añadiendo primero la fase oleosa, formada por una mezcla de Dodecano y Span 80, a la que se le hace

pasar una corriente de  $N_2$ . Por otro lado se disuelven en agua miliQ los monómeros de acrilamida, el reticulante BIS, el iniciador PAS y se somete igualmente a burbujeo con  $N_2$  con el fin de eliminar el  $O_2$  disuelto, que de otra forma intervendría en la reacción captando los radicales libres, paralizando la fase de iniciación de la polimerización [68]. A continuación se procede a formar la emulsión concentrada inyectando la fase acuosa gota a gota en la fase oleosa. El proceso se lleva a cabo en atmósfera inerte con agitación magnética. Así conseguimos una emulsión de aspecto blanco lechoso.



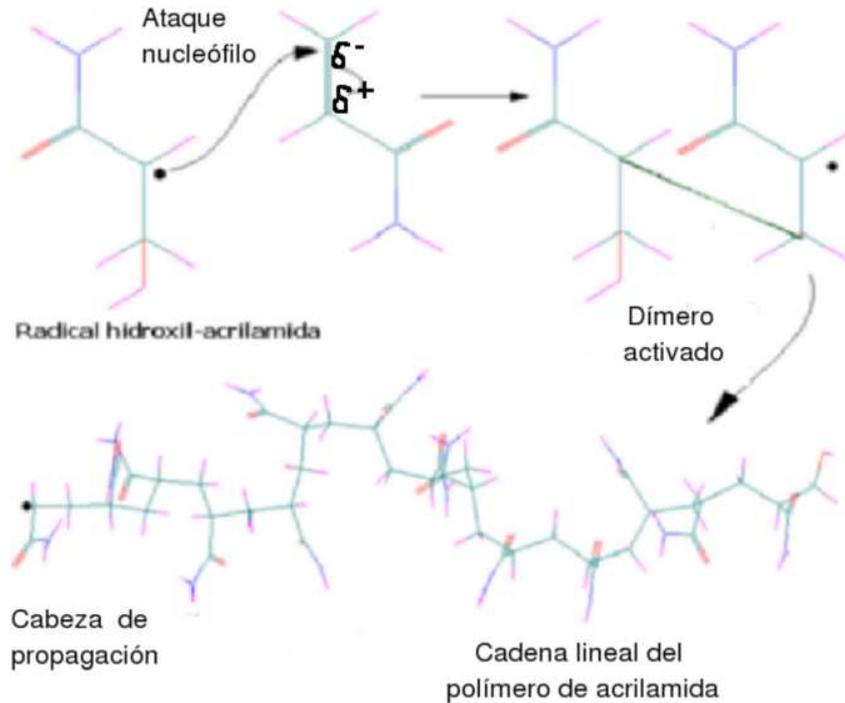
**Fig. 14** Esquema de una emulsión concentrada de fase externa acuosa e interna oleosa.

Una vez obtenida la emulsión concentrada, comienza la polimerización del monómero disuelto en las gotículas de la fase interna, añadiendo al sistema el TEMED, que actúa como catalizador de la reacción. Al añadir el catalizador comienza la reacción de polimerización la cual puede dividirse en tres etapas [68, 69]. En una primera etapa, denominada fase de iniciación, el persulfato de amonio se descompone generando radicales sulfato e hidroxilo, que dan lugar a un ataque electrofílico sobre el carbono  $\beta$  de la amida del monómero de acrilamida. Esto genera la formación de radicales acrílicos, figura 15.



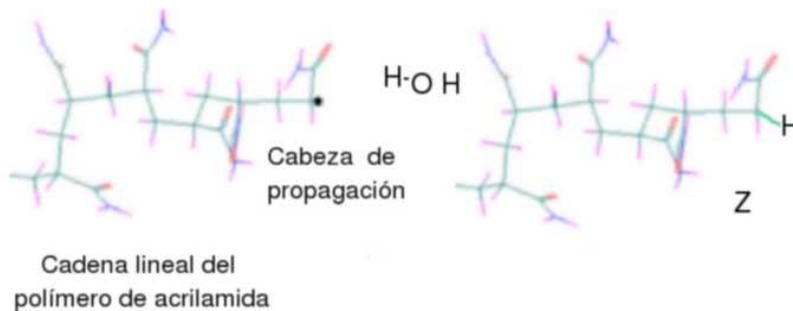
**Fig. 15** Fase de iniciación de la reacción de polimerización.

Estos radicales acrílicos inicialmente formados constituyen el punto de inicio de la polimerización de la acrilamida. Los radicales reaccionan con otros monómeros de acrilamida, mediante ataques electrofílicos al carbono  $\beta$  de la amida del monómero de acrilamida, dando lugar a la fase de elongación (figura 16).



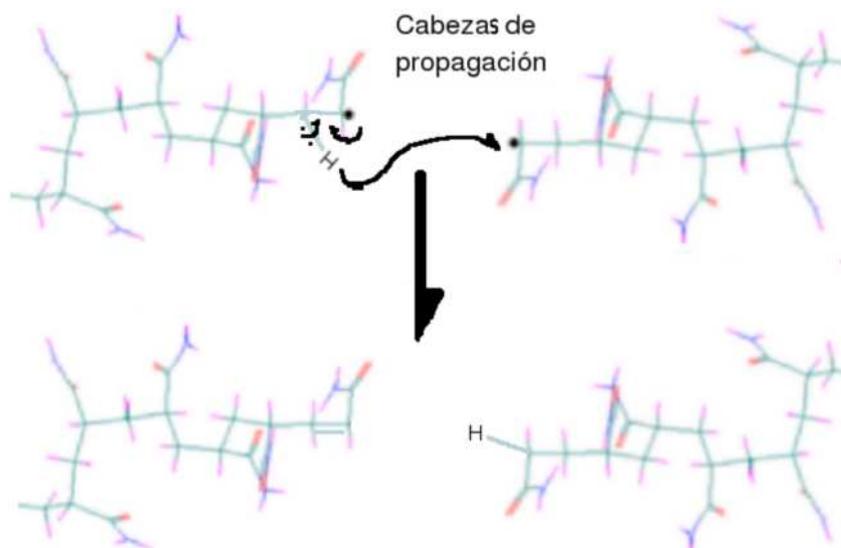
**Fig. 16** Fase de iniciación de la reacción de polimerización.

En esta fase de elongación los radicales acrílicos, al reaccionar con el monómero generan una cadena polimérica, en cuyos extremos se encuentra la denominada cabeza de crecimiento. Esta cabeza de crecimiento se corresponde con un radical que continúa los ataques nucleofílicos sobre otros monómeros, dando como resultado el incremento en el tamaño de la cadena. La reacción de polimerización en la cadena de polímero puede llegar a su fin a través de tres procesos diferentes. El primero puede estar mediado por una transferencia de  $H^\bullet$  procedente del  $H_2O$  al macrorradical, tal y como se muestra en la figura 17.



**Fig. 17** Fase de terminación vía transferencia de  $H^\bullet$  al macrorradical.

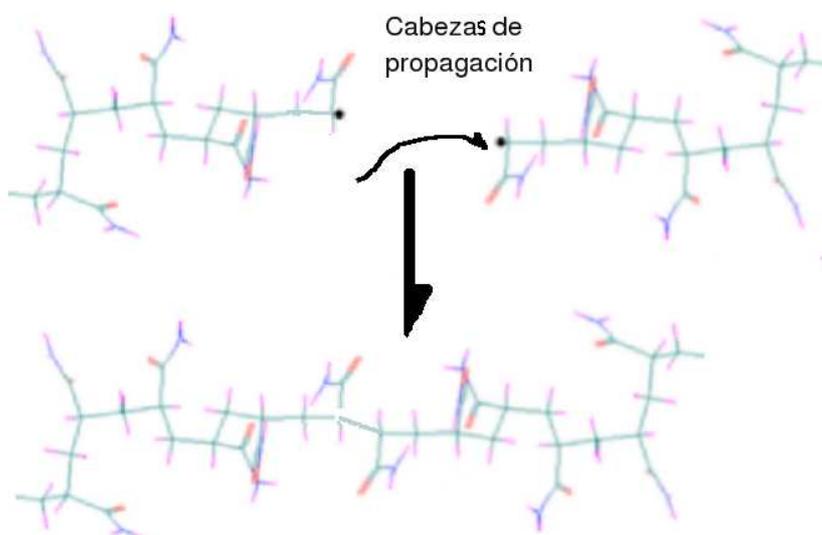
En otros casos puede finalizar la reacción por medio de un proceso de dismutación entre dos macro-radicales enfrentados, como se muestra en la figura 18.



**Fig. 18** Fase de terminación vía dismutación de los macrorradicales.

En este proceso se produce la transferencia del un  $H^\bullet$   $\alpha$  radical hacia otro macrorradical, acabando el crecimiento en esta cadena. Como resultado, en la cadena donante se forma un doble enlace entre el carbono  $\alpha$  y el carbono del radical, finalizando así el crecimiento de la misma.

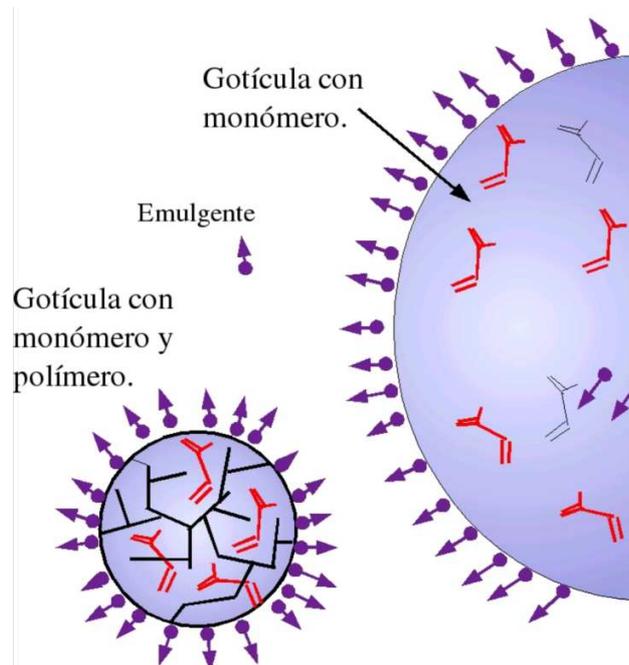
Por último el crecimiento de la cadena puede concluir como consecuencia de la formación de un enlace entre dos cabezas de crecimiento, tal y como se observa en la figura 19.



**Fig. 19** Fase de terminación vía formación de enlaces entre macrorradicales.

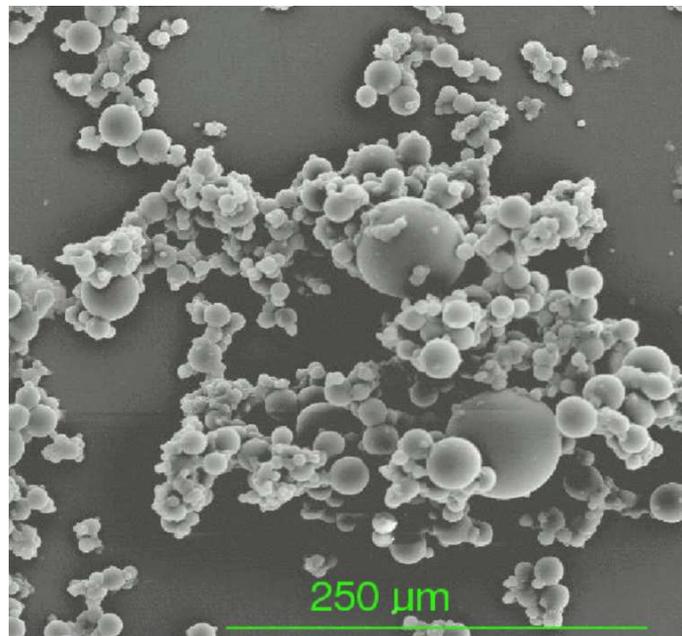
Finalizada la reacción de polimerización, el sistema se mantiene en agitación durante 50 minutos. Finalmente se extraen las micropartículas utilizando metanol frío. De esta manera se recupera el agua del sistema precipitando las micropartículas, después se centrifugan a 5000 r.p.m. durante 5 minutos y el precipitado se lava con acetona [90, 91]. A continuación las micropartículas se liofilizan y se guardan en una cámara

frigorífica a 4°C. La figura 20 muestra un esquema de las gotículas de la emulsión concentrada en las que está disuelto el monómero y en las que tiene lugar el proceso de polimerización.



**Fig. 20** Esquema de la polimerización en las gotículas de la emulsión en las que se han disuelto previamente los precursores de la polimerización.

La figura 21 muestra una micrografía electrónica de barrido de las micropartículas de poli(acrilamida) resultantes del proceso de polimerización anterior.

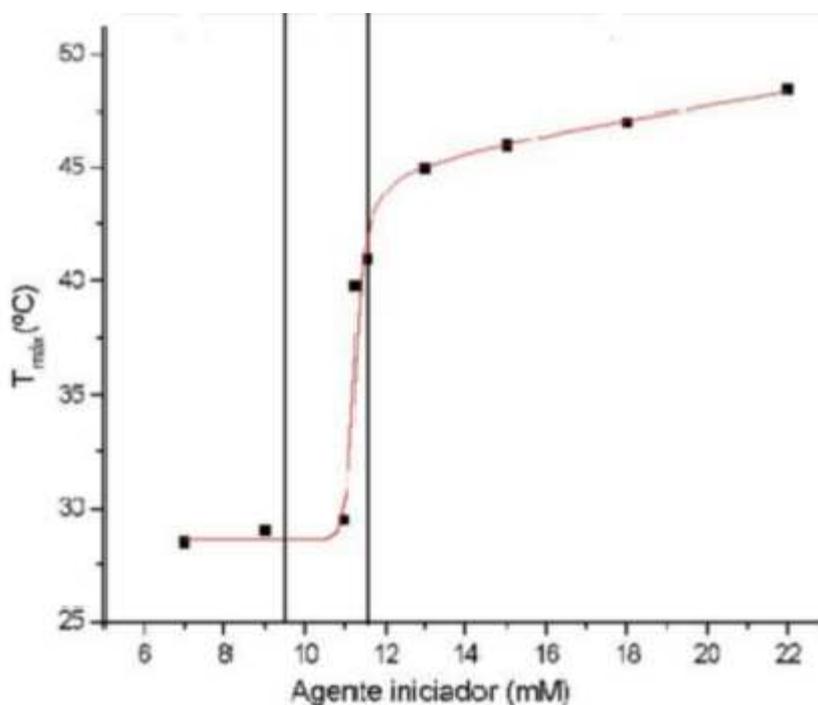


**Fig. 21** Micrografía electrónica de las micropartículas de poli(acrilamida) sintetizadas a partir del método de polimerización en emulsión concentrada.

Como resultado de la polimerización del monómero en las micropartículas constituyentes de la emulsión se genera un polímero de alto peso molecular con la misma forma esférica que la gotícula precursora, figura 21. La composición y las cantidades de los constituyentes de la emulsión precursora son mostrados en la Tabla 1. **Tabla 1.** Composición de las fases oleosas y acuosas de la emulsión.

<b>Fase Oleosa</b>	Cantidad	(%)
Dodecano	750 $\mu$ L	10,42 %
Span 80	250 $\mu$ L	3,47 %
<b>Fase Acuosa</b>		
Agua MiliQ	5mL	86,11 %
Acrilamida	1,25g	3,51 M
NN-metil-bisacrilamida	66,5mg	88 mM
Persulfato de amonio	12,5 mg	11 mM
NNNN-tetra-metil-etilendiamina	63 $\mu$ L	32 mM

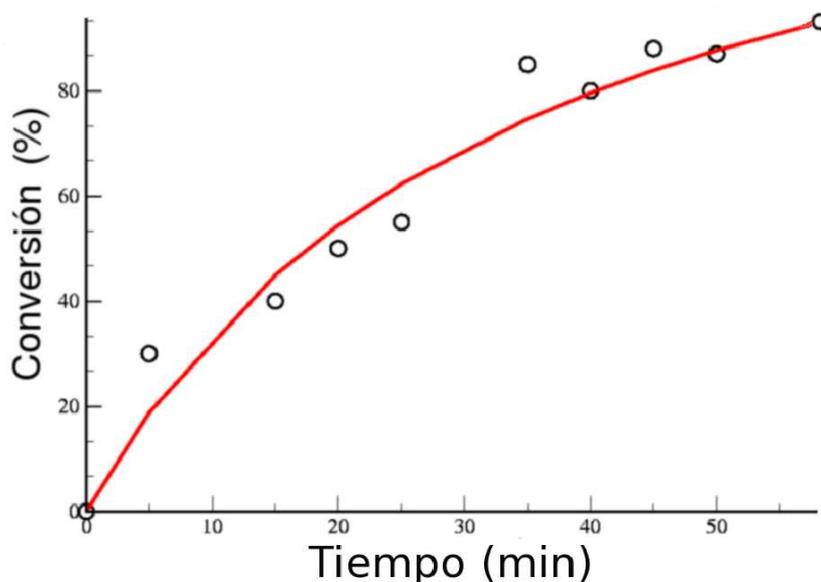
En el caso de la síntesis de las micropartículas con GOx, se reemplaza en la fase acuosa, el agua miliQ, por solución reguladora de fosfato sódico 0,1M a pH 6. Además, y durante la extracción de las micropartículas, el metanol frío es sustituido por solución reguladora de fosfato frío a pH 6. Con estas medidas se intenta proteger el enzima de un tratamiento excesivamente agresivo durante la polimerización. Para optimizar más la inmovilización enzimática se ha estudiado la influencia de la concentración de agente iniciador en la temperatura y en la cinética de polimerización.



**Fig. 22** Temperatura máxima de polimerización en función de la cantidad de agente iniciador.

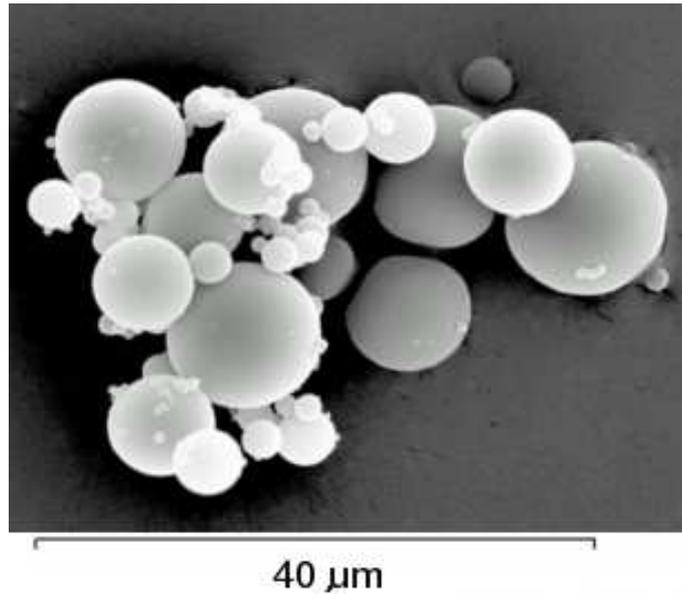
Como se ha descrito anteriormente la reacción de polimerización empleada en la síntesis de las micropartículas responde a una reacción de tipo radicalario que en este caso es además exotérmica, lo que produce un aumento de temperatura durante la polimerización. Este incremento de la temperatura está relacionado con la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. La figura 22 muestra la temperatura máxima de polimerización obtenida durante el reacción química en función de las diferentes cantidades de agente iniciador utilizado.

Aquí se puede observar, como en un rango de concentración comprendido entre 7 mM y 11 mM de agente iniciador, la temperatura de polimerización se mantiene constante en 27°C. Sin embargo a partir de 11,5 mM la temperatura aumenta desde los 27°C hasta 45°C. A partir de aquí, concentraciones de agente iniciador superiores a 13 mM producen ligeros incrementos en la temperatura máxima de polimerización. Debido a estos resultados se van a utilizar 11 mM de PAS como cantidad óptima para las síntesis de las micropartículas con GOx en su interior. Además conviene minimizar el tiempo durante el cual la enzima se mantiene en el seno de la polimerización, por ello se ha estudiado la cinética de polimerización de las micropartículas en función del tiempo cuando se utiliza una concentración de 11 mM de agente iniciador (figura 23).



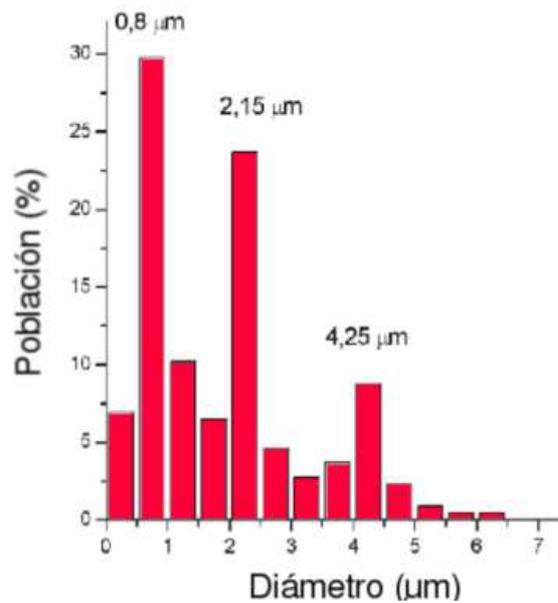
**Fig. 23** Rendimiento de la reacción de polimerización en función del tiempo utilizando una concentración de 11,5 mM.

Como se puede apreciar en la figura 23, la conversión del monómero a polímero es realizada aproximadamente en 40 minutos. Por lo tanto se establecerá dicho tiempo como el necesario para realizar la síntesis. Utilizando las concentraciones de agente iniciador y los tiempos anteriormente seleccionados se obtienen micropartículas de poli(acrilamida) con GOx en su interior como las mostradas en la figura 24.



**Fig. 24** Micrografía electrónica de barrido de las micropartículas con GOx en su interior.

La figura 25 muestra el estudio poblacional realizado en estas micropartículas a partir de las micrografías SEM.



**Fig. 25** Estudio poblacional de las micropartículas con GOx con en su interior.

De este estudio se desprende la existencia de tres poblaciones claramente diferenciadas de micropartículas. Las poblaciones de micropartículas más pequeñas y comprendidas entre 0,8 y 2,15  $\mu\text{m}$  se corresponderían con las gotículas que en la emulsión concentrada estarían ocupando los espacios vacíos dejados entre las micropartículas de tamaño 4,5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2. Análisis estructural de las micropartículas de poli(acrilamida).

Un factor a tener en cuenta para encapsular el enzima en una matriz polimérica es conocer las características estructurales de dicha matriz, debido a que sus propiedades varían de forma significativa como consecuencia del grado de reticulación, el cual está directamente relacionado con la cantidad de BIS utilizado en su síntesis. El grado de reticulación,  $\chi$ , se define como la cantidad de agente reticulante por gramo de polímero en tanto por ciento.

$$\chi = \frac{Ar_{(g)}}{M_{(g)} + Ar_{(g)}} \times 100 \quad (3.2)$$

Donde  $Ar_{(g)}$  son los gramos de agente reticulante y  $M_{(g)}$  son los gramos de monómero.

Este parámetro es sumamente importante en el atrapamiento enzimático ya que define el tamaño del poro de la matriz polimérica y como consecuencia la efectividad de la inmovilización enzimática. Además  $\chi$  puede modificar otros parámetros estructurales del polímero como son la temperatura de transición vítrea, así como la cantidad de agua que el polímero es capaz de retener, fenómenos por otra parte ampliamente reportados [92, 21]. La inclusión del enzima en el seno de la matriz de polímero va a producir a su vez cambios en la estructura polimérica [90, 93]. Estos cambios y alteraciones en la estructura han sido estudiados mediante técnicas de DSC, rayos X y difracción de neutrones.

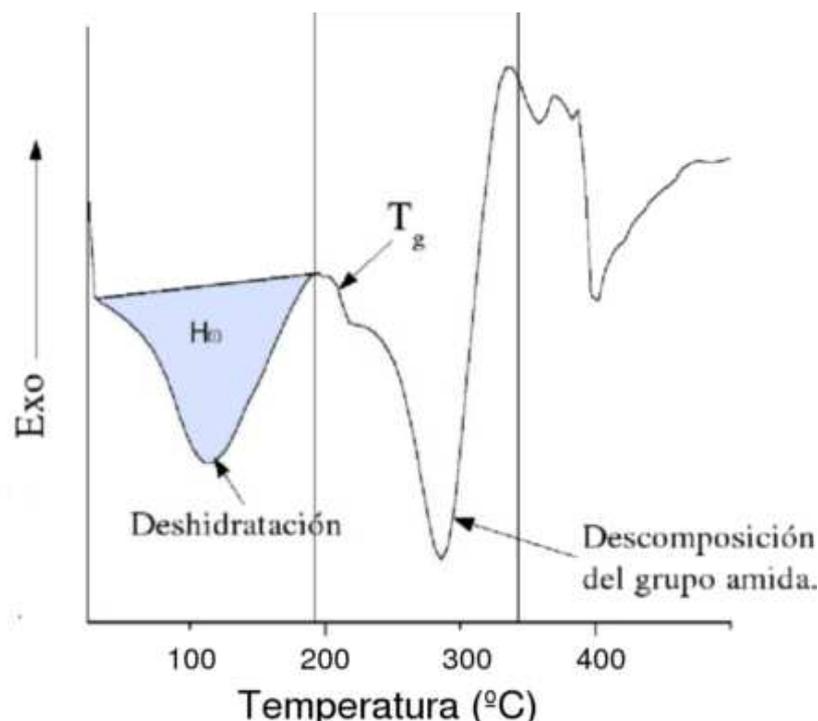
#### Caracterización mediante DSC

Para llevar a cabo este estudio se prepararon 14 tipos de micropartículas de poli(acrilamida). Estas partículas fueron divididas en 2 grupos con la única diferencia de la presencia o ausencia de GOx en su interior. Además dentro de cada grupo se varió el grado de reticulación de las muestras con el fin de tener un amplio espectro de muestras con diferente reticulación. La tabla 2 muestra el contenido de agente reticulante, en cada una de las muestras estudiadas.

**Tabla 2.** Contenido de agente reticulante  $\chi$  en las micropartículas de poli(acrilamida) con y sin GOx.

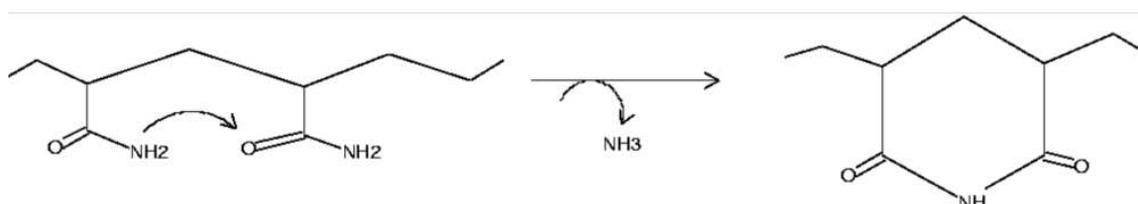
Micropartículas sin GOx	Micropartículas con GOx
0 %	0 %
0,7 %	0,7 %
1,5 %	1,5 %
3,0 %	3,0 %
4,0 %	4,0 %
5,0 %	5,0 %
6,0 %	6,0 %

Cuando una muestra de micropartículas de poli(acrilamida) es analizada utilizando un DSC se obtiene un registro como el que se muestra en la figura 26.



**Fig. 26** Registro calorimétrico de micropartículas de poli(acrilamida) vacías.

En este registro se puede observar la existencia de 3 zonas claramente diferenciadas: La zona 1 se corresponde con un proceso endotérmico de desecación y evaporación del agua que hidrata las micropartículas. En la zona 2 se puede apreciar como el proceso de desecación ha concluido. En este rango de temperatura existe un descenso en la  $C_p$  de la muestra que se podría correspondre con la  $T_g$  del polímero. A partir de los 250°C comienza un proceso de descomposición endotérmica de los grupo amida y su conversión en grupos imida, con la consiguiente eliminación de  $NH_3$  [70]. Esta descomposición presenta un mínimo cercano a 270°C. La figura 27 esquematiza el proceso de descomposición del grupo amida y su transformación en grupo imida.



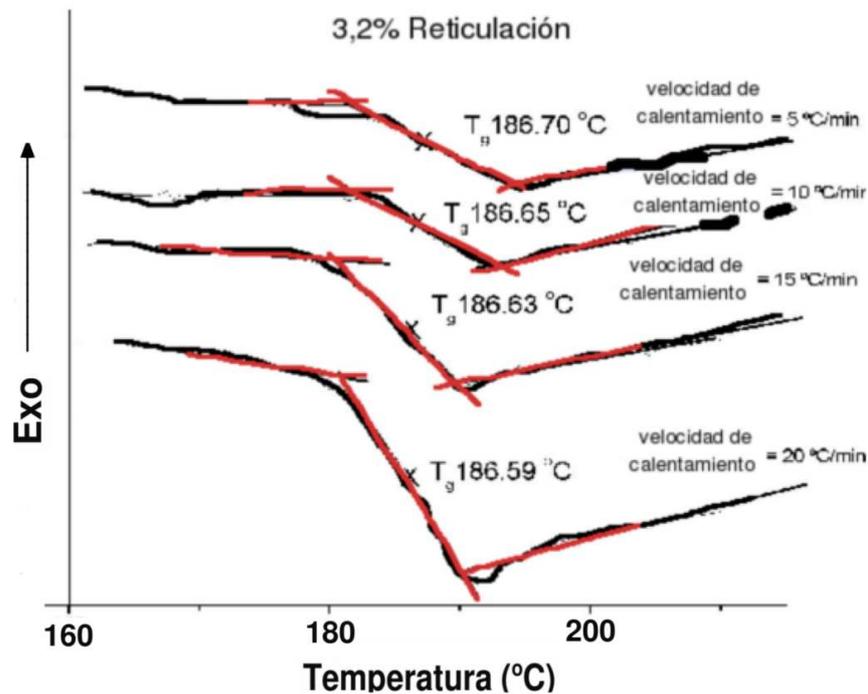
**Fig. 27** Reacción de descomposición de los grupos amida de la poli(acrilamida) y formación de enlaces imida.

En la zona 3 el polímero sufre sucesivas reacciones de descomposición con la consiguiente liberación de  $CO_2$  y  $NH_3$ .

**Determinación de la  $T_g$  del polímero.** La temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , es un parámetro muy importante en la caracterización de los polímeros, ya que se corresponde con la temperatura a la cual las cadenas del polímero sufren movimientos locales de tipo micro-Browniano [68]. Este parámetro está relacionado con la

rigidez del polímero y por ello se ve influido por factores que modifican la estructura del polímero, tales como la concentración de agente reticulante, presencia de agua e incluso el atrapamiento de sustancias en su interior.

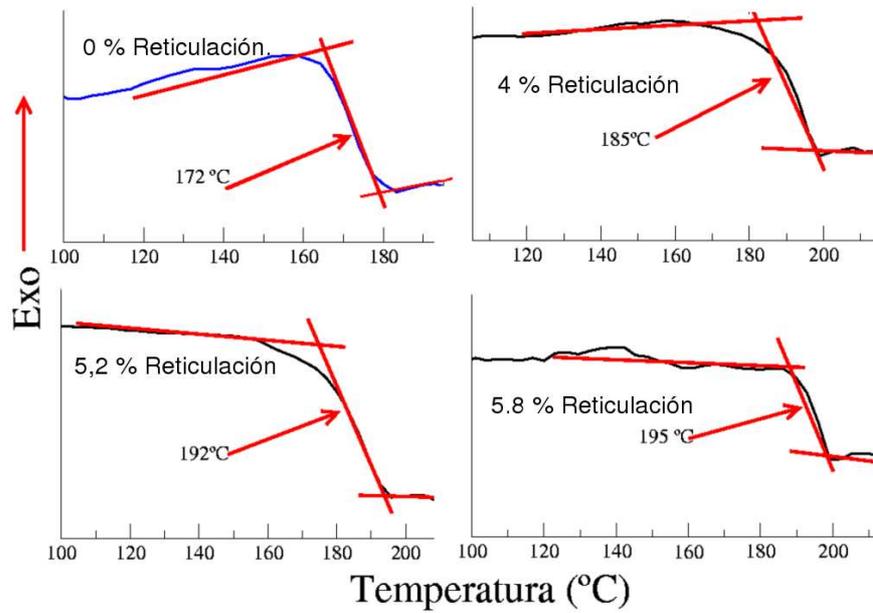
Con el fin de definir claramente la  $T_g$  en los registros calorimétricos, es necesario desecar previamente las muestras. Para conseguir dicha desecación se someten todas las muestras de polímero a un tratamiento térmico que consiste en calentarlas durante 10 minutos a  $150^\circ\text{C}$ . Así se consigue la eliminación del agua de las mismas y definir una  $C_p$  constante desde  $25^\circ\text{C}$  hasta los  $180^\circ\text{C}$  aproximadamente. Entorno a  $180^\circ\text{C}$  se puede observar una caída en  $C_p$ , caída que se corresponde con la  $T_g$ . La figura 28 representa la típica caída en la  $C_p$  del polímero en el rango comprendido entre los  $160^\circ\text{C}$  y los  $200^\circ\text{C}$ .



**Fig. 28**  $T_g$  de una muestra de micropartículas de poli(acrilamida) realizada a diferentes velocidades en un intervalo de temperatura comprendido entre  $160$  y  $215^\circ\text{C}$ .

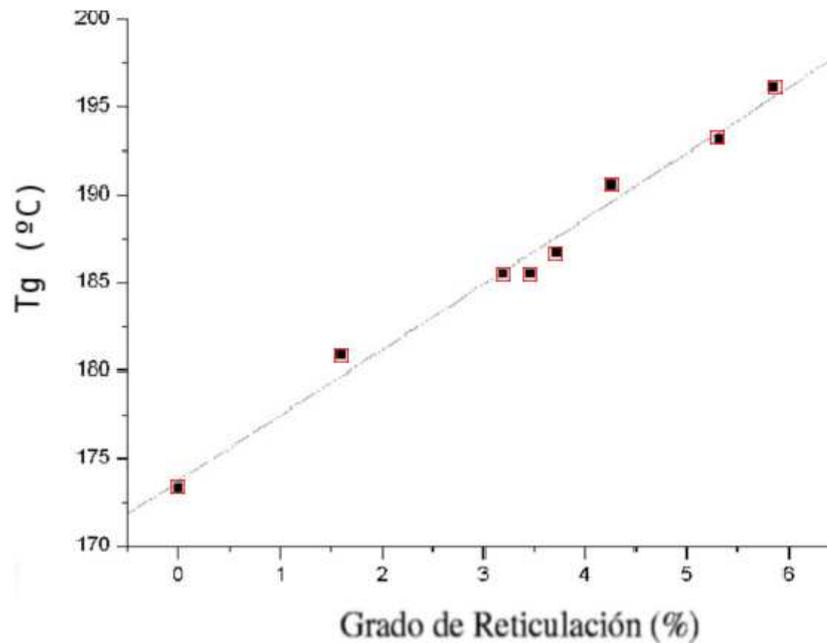
Aunque la caída en  $C_p$  se ve afectada por la velocidad de calentamiento, la temperatura de transición vítrea se mantiene constante en  $186,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  independientemente de la velocidad de barrido. Debido al resultado anterior se ha elegido  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  como la velocidad de calentamiento para hacer el estudio.

Cuando se estudia la  $T_g$  en función del grado de reticulación se puede observar un aumento de dicha  $T_g$  a medida que aumenta el grado de reticulación (figura 29).



**Fig. 29** Registros calorimétricos de muestras de micropartículas con diferentes grados de reticulación.

La figura 30 muestra que la representación de la  $T_g$  obtenida en función del grado de reticulación de las micropartículas sin GOx en su interior siguen un comportamiento lineal.



**Fig. 30** Representación de la  $T_g$  en función del grado de reticulación en micropartículas sin GOx en su interior.

La dependencia de la  $T_g$  con el grado de reticulación se puede expresar mediante la ecuación:

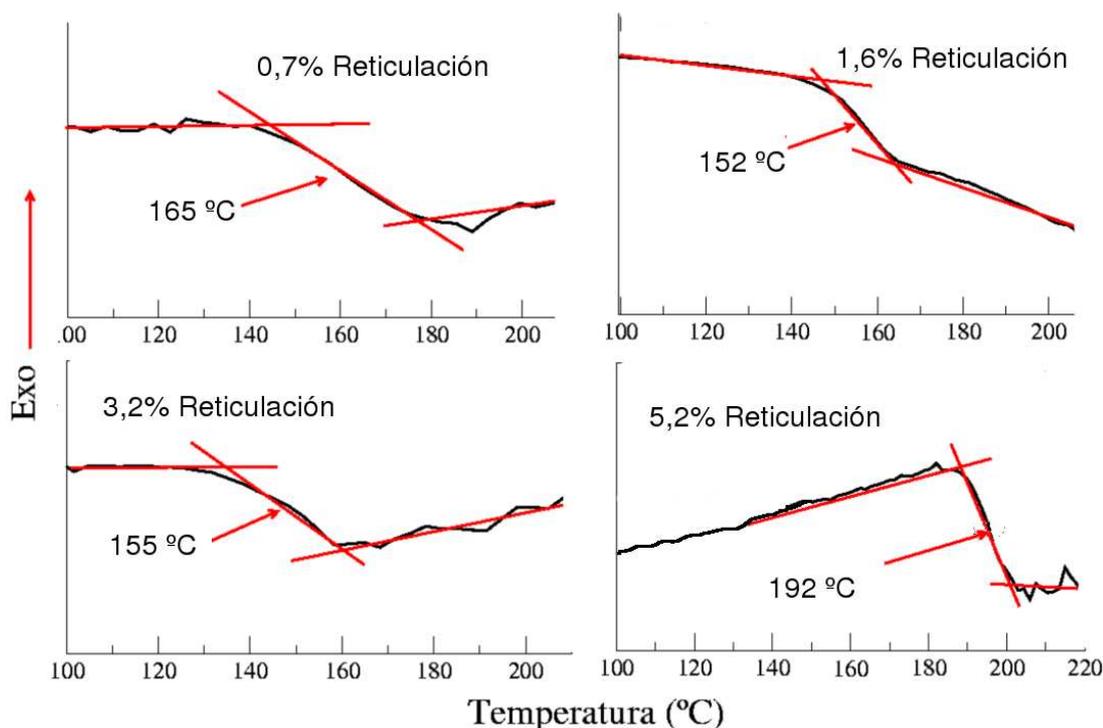
$$\frac{T_g - T_0}{T_0} = \frac{\frac{KM\chi}{\gamma}}{1 - \frac{KM\chi}{\gamma}} \quad (3.3)$$

Donde  $T_g$  es la temperatura de transición vítrea del polímero,  $T_0$  es la temperatura de transición vítrea del polímero sin agente reticulante,  $K$  es una constante independiente del polímero cuyo valor es aproximado a  $1,3 \times 10^{23}$ ,  $M$  es la masa molecular del monómero,  $\chi$  es la concentración de agente reticulante y  $\gamma$  hace referencia al número de enlaces flexibles por unidad monomérica. Esta ecuación se puede simplificar en la ecuación 3.4, cuando se emplean pequeñas cantidades de agente reticulante. El ajuste en nuestro caso está definido por la ecuación 3.5.

$$T_g = T_0 + K\chi \quad (3.4)$$

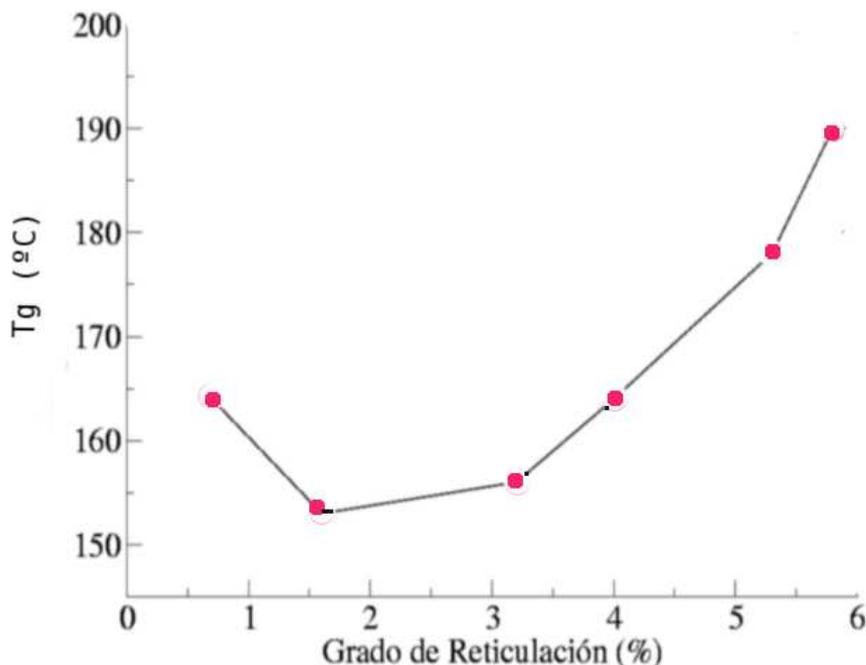
$$T_g = 173,8 + 3,73\chi \quad (3.5)$$

Esta ecuación prevé un aumento de la  $T_g$  del polímero con el contenido de agente reticulante, consecuencia directa del aumento de la rigidez del polímero. En el caso de las micropartículas con GOx se puede observar como al variar la concentración de agente reticulante se produce una variación peculiar de la  $T_g$  tal y como se muestra en la figura 31.



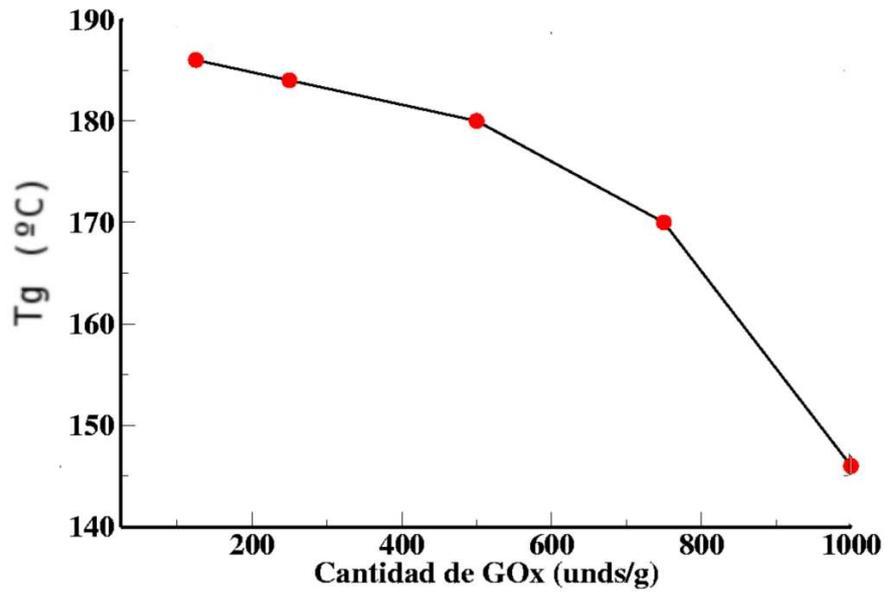
**Fig. 31** Registros calorimétricos de micropartículas de poli(acrilamida) con diferente grado de reticulación con GOx en su interior.

La figura 32 muestra la representación de la  $T_g$  de estas muestras en función del grado de reticulación de las micropartículas con GOx.



**Fig. 32** Representación de la  $T_g$  de las micropartículas de poli(acrilamida) con GOx en función del grado de reticulación.

En esta figura se puede observar que a medida que aumenta el grado de reticulación, la  $T_g$  disminuye hasta llegar a un mínimo que se corresponde con un grado de reticulación 3,2 %, a partir del cual un incremento en el porcentaje de reticulante del polímero produce un incremento en la  $T_g$  del mismo. Este comportamiento podría estar relacionado con la concentración de enzima que hay en las micropartículas de poli(acrilamida). Tal y como se muestra en la figura 32 la extrapolación de la  $T_g$  del polímero a  $\chi = 0$  da una  $T_g$  muy similar a la de las micropartículas sin enzima. En estos grados de reticulación se ha podido observar como los sobrenadantes obtenidos tras la síntesis presentan actividad enzimática, lo que indica que parte del enzima ha salido fuera de las micropartículas. Para grados de reticulación pequeños el tamaño de poro es grande y se produce la salida del enzima fuera de la micropartícula. Sin embargo a medida que aumenta la cantidad de agente reticulante, el tamaño del poro se va haciendo cada vez menor hasta que para una reticulación dada el enzima queda inmovilizado. Este aumento en la cantidad de enzima retenida en las micropartículas está relacionada con la disminución de la  $T_g$ , hasta que se llega al grado de reticulación de 3,2% a partir del cual no se observa actividad enzimática en el sobrenadante obtenido tras las síntesis. A partir de esta reticulación el enzima queda inmovilizado en el interior de las micropartículas y se observa que un incremento en la fracción de agente reticulante produce un incremento en la  $T_g$  del polímero. Teniendo en cuenta estos datos es posible que el enzima actúe de forma similar a la de un plastificante disminuyendo la  $T_g$  del polímero.



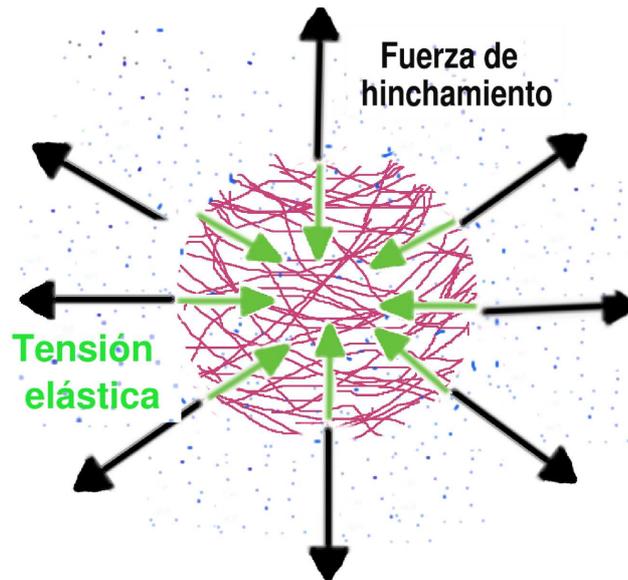
**Fig. 33**  $T_g$  de las micropartículas en función del contenido de GOx en su interior.

Con el fin de comprobar este efecto plastificante producido por la enzima se han sintetizado micropartículas con un grado de reticulación de 3,2% en las que se han inmovilizado diferentes cantidades de enzima. El resultado se muestra en la figura 33. En dicha figura se observa como a medida que aumenta la cantidad de GOx en el interior de las micropartículas se produce una disminución en la  $T_g$  lo que parece confirmar nuestra interpretación de la  $T_g$  en función del contenido de agente reticulante para el caso de las micropartículas con GOx en su interior.

**Determinación del agua de hidratación.** Otro parámetro que se ve influido por el grado de reticulación es la cantidad de agua que el polímero es capaz de almacenar en su interior, ya que influirá en el tamaño de las micropartículas y como consecuencia en el espesor de la barrera difusional que deberán atravesar tanto el producto como el sustrato [71]. La poli(acrilamida) es un polímero capaz de hidratarse fijando gran cantidad de agua en su estructura, lo que produce un aumento del volumen del polímero y como consecuencia se alteran las distancias de separación que existe entre las cadenas del polímero, es decir, el diámetro del poro. Según la teoría de Flory-Huggins, el hinchamiento de una red de polímero está gobernada por tres términos de energía libre, que son: cambios en la energía libre de mezcla  $\Delta G_m$ , energía libre de deformación elástica  $\Delta G_{el}$  y energía libre de interacciones electrostáticas  $\Delta G_i$  [72, 73, 74, 75].

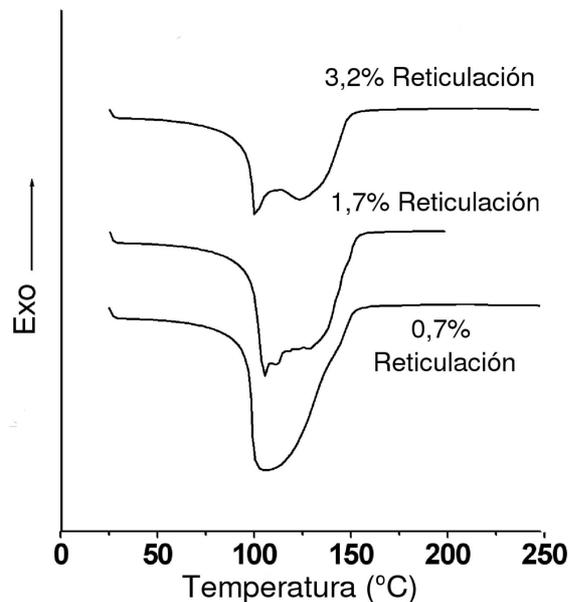
$$\Delta G = \Delta G_m + \Delta G_{el} + \Delta G_i \quad (3.6)$$

Los términos de la expresión 3.6 pueden dividirse en dos tipos:  $\Delta G_m$  y  $\Delta G_i$ , fuerzas a favor del hinchamiento del polímero que hacen que entre agua en la red polimérica interna y opuesta a estas fuerzas, existe una tensión,  $\Delta G_{el}$  que está directamente relacionada con el grado de reticulación de la micropartícula.



**Fig. 34** Esquema de las tensiones a las que se encuentra sujeto una micropartícula cuando se encuentra en el seno de una solución acuosa.

En conjunto se puede establecer que el hinchamiento de los polímeros está gobernado por dos tipos de fuerzas contrapuestas, entre las que existe una dependencia clara con el grado de reticulación.



**Fig. 35** Termogramas de micropartículas hidratadas con diferente cantidad de agente reticulante.

Para calcular el agua de hidratación de las muestras de polímero a diferentes grados de reticulación, se ha utilizado el DSC. Como se puede observar en la figura 35 a medida que disminuye la concentración de agente reticulante la entalpía de evaporación del agua  $\Delta H_w$  aumenta, debido a que hay mayor cantidad de agua inmovilizada en

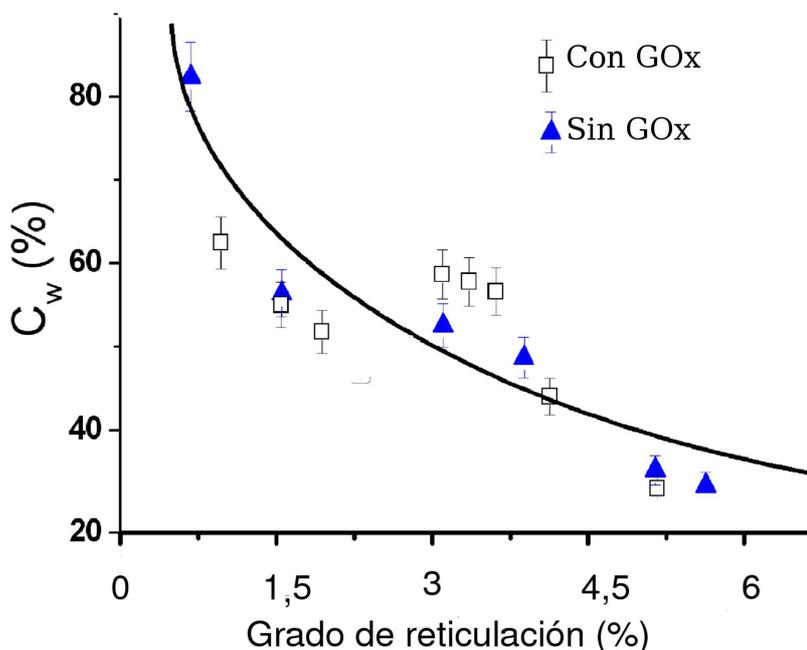
las micropartículas. Teniendo en cuenta que la entalpía de evaporación del agua,  $\Delta H_w$ , en la muestra viene dada por:

$$\Delta H_w = C_p m_w \Delta T + \Delta H_{evap} m_w \quad (3.7)$$

Donde  $\Delta H_w$  es la energía aportada por el DSC para desecar la muestra,  $C_p$  es la capacidad calorífica del agua,  $\Delta T$  es la variación de la temperatura necesaria para llegar a la temperatura de evaporación,  $m_w$  es la masa de agua y  $\Delta H_{evap}$  es la entalpía de evaporación del agua. Es posible calcular la masa de agua que forma parte de las micropartículas  $m_w$ . Así, calculada  $m_w$  se obtiene el porcentaje de agua en las micropartículas según la expresión:

$$C_w(\%) = \frac{m_w}{m_w + m_p} \times 100 \quad (3.8)$$

La figura 36 muestra la representación de  $C_w(\%)$  en función del grado de reticulación.

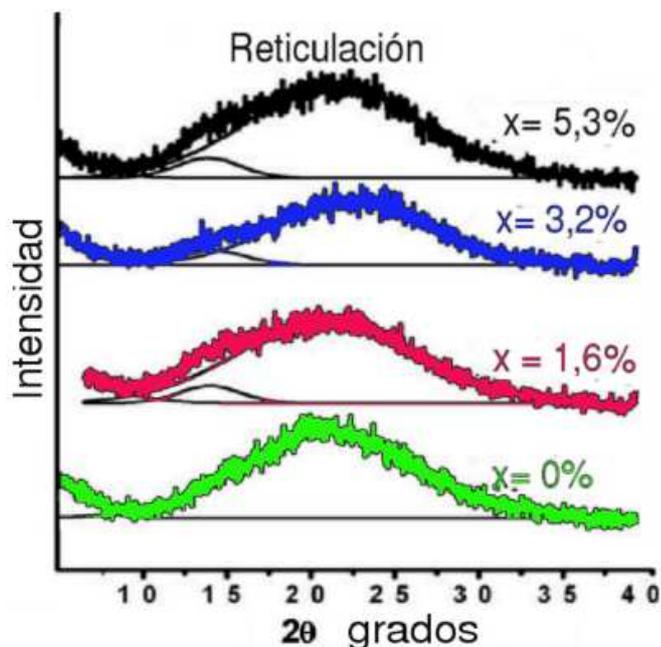


**Fig. 36** Porcentaje de agua acumulada con respecto al peso del polímero,  $C_w$ , en función de la cantidad de agente reticulante en micropartículas con y sin GOx.

En la gráfica se aprecia como al disminuir la cantidad de entrecruzamientos en la red, aumenta la capacidad del polímero para hincharse y como consecuencia la cantidad de agua retenida dentro de la micropartícula de forma exponencial. Valores similares han sido obtenidos por otros autores como Furukawa y col [92].

## Caracterización mediante difracción de rayos X

La caracterización estructural del polímero se ha realizado utilizando difracción de rayos X barriendo la región angular entre  $2\theta = 3^\circ$  y  $2\theta = 40^\circ$ . En la figura 36 se representa los difractogramas obtenidos de cuatro muestras de micropartículas que por su contenido en agente reticulante son representativas del conjunto pues cubren el espectro de las concentraciones de agente reticulante utilizadas.



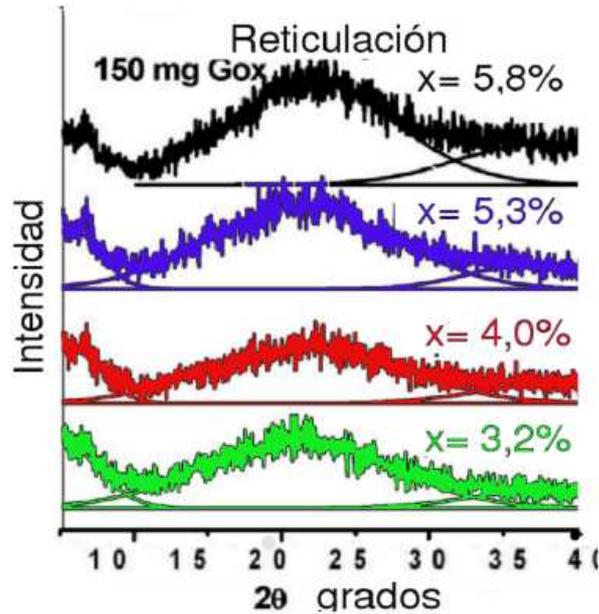
**Fig. 37** Difracción de rayos X de micropartículas sin GOx.

En la figura 37 se observa como el espectro de la muestra que carece de agente reticulante a temperatura ambiente, presenta un halo amorfo con un máximo en  $2\theta = 21,38^\circ$  que según la ley de Bragg ecuación (3.9) se corresponde con una distancia de  $4,1 \text{ \AA}$  que es aproximadamente la distancia de separación entre grupos amida dentro de una cadena de polímero.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (3.9)$$

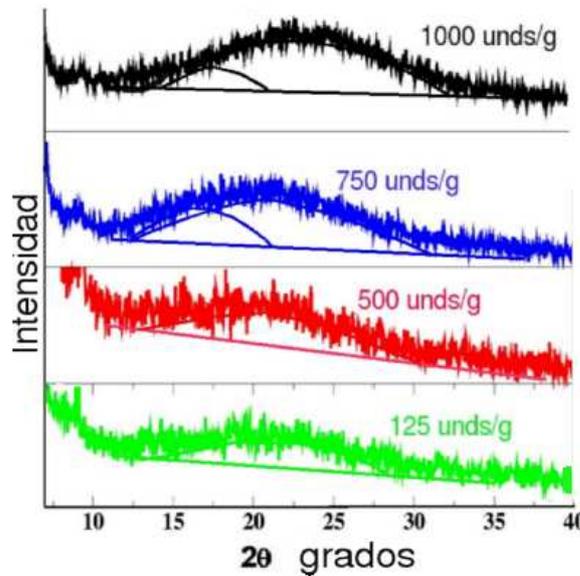
Donde  $n$  es el número de orden,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X,  $\theta$  es el ángulo de reflexión, y  $d$  es la distancia en  $\text{Å}$ . Además el difractograma muestra la existencia de un segundo halo amorfo, sólo en muestras reticuladas, que se localiza en  $2\theta = 13,93^\circ$ . Este ángulo se corresponde con una distancia de  $6,35 \text{ \AA}$ , distancia muy aproximada a la existente entre los grupos amidas de una molécula de BIS.

Cuando se introduce GOx en el interior de las micropartículas se sigue observando una estructura polimérica amorfa, en la que existe un pequeño desplazamiento en el halo central desde  $2\theta = 21,38^\circ$  hasta  $2\theta = 21,01^\circ$  lo cual se corresponde con una variación desde  $4,1 \text{ \AA}$  hasta  $4,3 \text{ \AA}$  (figura 38).



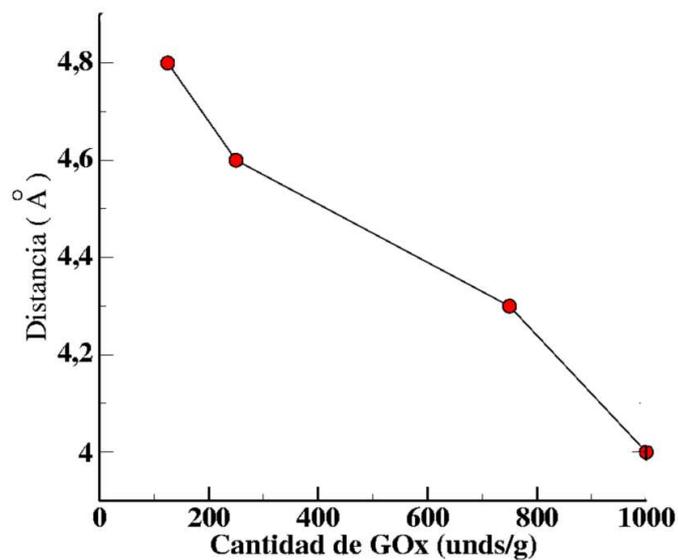
**Fig. 38** Difracción de rayos X de micropartículas con GOx.

La figura 39, muestra los registros de difracción de micropartículas en función de la cantidad GOx en su interior. La cantidad de GOx inmovilizada está definida como las unidades internacionales (U.I.) por gramo de polímero.



**Fig. 39** Difracción de rayos X de micropartículas en función de la concentración de enzima inmovilizada.

En la figura 39, se puede observar como existe un desplazamiento en el halo amorfo del polímero hacia ángulos mayores a medida que aumenta la cantidad de GOx inmovilizada. La representación de las distancias correspondientes a estos ángulos en función de la cantidad de enzima inmovilizada se muestra en la figura 39.

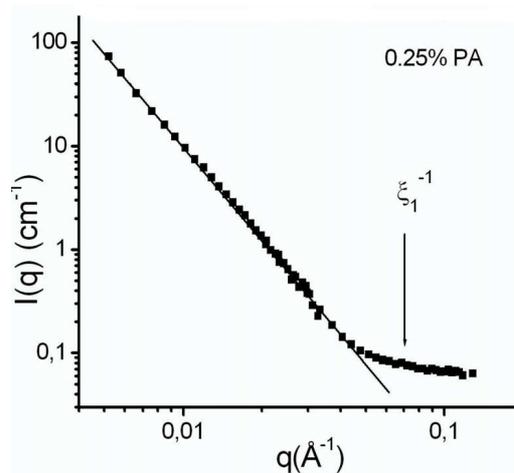


**Fig. 40** Distancia del halo amorfo de las microparticulas, en función de la concentración de GOx.

En esta representación se puede ver como incrementos en la cantidad de GOx inmovilizada producen un descenso en la posible distancia de separación de los residuos amida del polímero, lo cual podría ser debido a interacciones electrostáticas o por puentes de hidrógeno entre el enzima y la estructura del polímero.

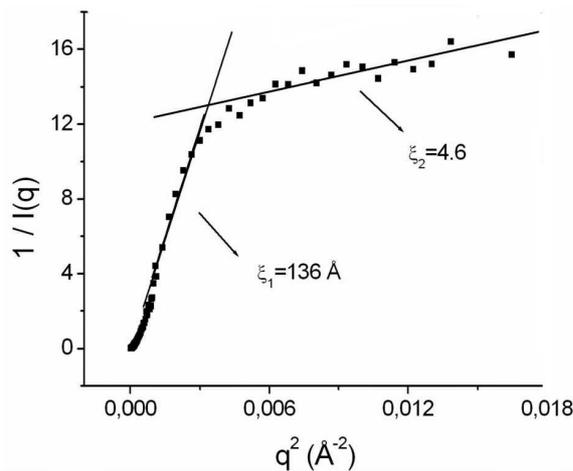
## Caracterización mediante difracción de neutrones.

La difracción de neutrones a bajo ángulo puede considerarse una técnica complementaria a la difracción de rayos-X, particularmente para el estudio de la estructura y de las propiedades de la red polimérica. En este estudio la difracción de neutrones constituye una poderosa técnica, gracias al amplio rango de distancias que puede estudiar. Esto le permite ver variaciones en la acomodación de la red tanto a pequeña escala, como a gran escala. La figura 41 muestra la representación de doble logaritmo del diagrama de difracción de neutrones de las micropartículas de poli(acrilamida) con grado de reticulación 0,25 %.



**Fig. 41** Doble logaritmo de los datos presentados en la figura 2, ajustados a una pendiente  $d_F = -3$

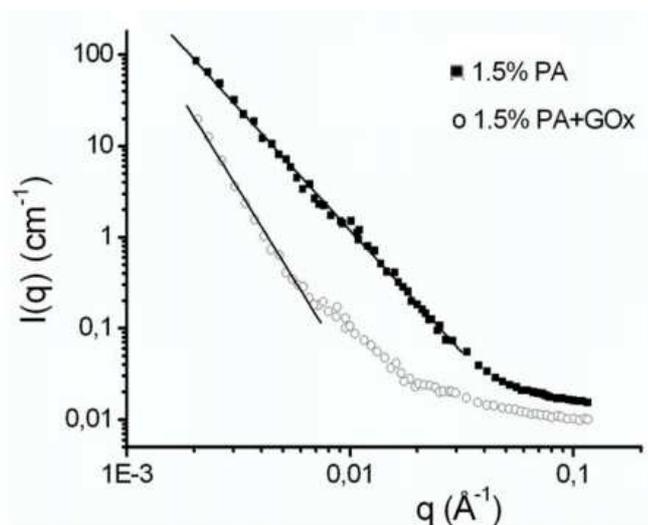
En esta figura se observa como la  $I(q)$  aumenta cuando  $q \sim 0,048 \text{ \AA}^{-1}$ . Para valores de  $q < 1/\xi$ , se define  $I(q) \sim q^{-3}$ , para valores de  $q > 1/\xi$   $I(q)$  es descrita por la función de Ornstein-Zernike.



**Fig. 42** Representación de Ornstein-Zernike del espectro de difracción de micropartículas de poli(acrilamida) con 0,25 % de reticulación. A partir de las pendientes se determina la distancia de correlación  $\xi_1$  y  $\xi_2$ .

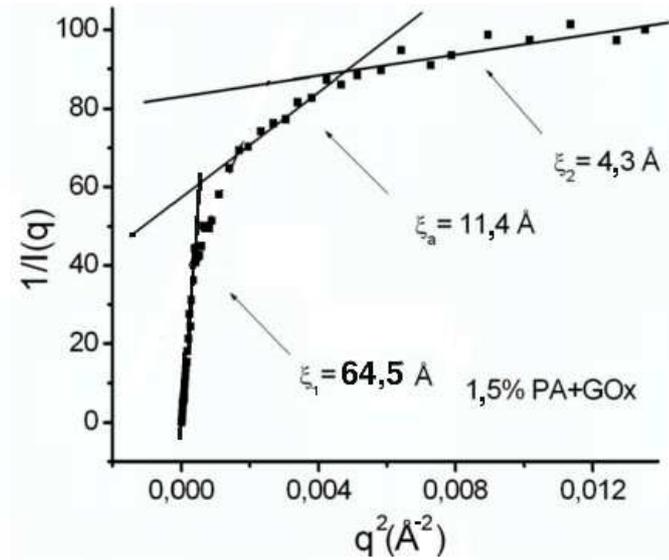
En la figura 42 se muestra la representación de Ornstein-Zernike del espectro de difracción de micropartículas de poli(acrilamida) con 0,25 % de reticulación en  $D_2O$ . De las pendientes se obtienen las distancias de correlación de la red de polímero,  $\xi_1 = 136\text{\AA}$  y que  $\xi_2 = 4,6\text{\AA}$ . Según la teoría de Flory-Rehner [94, 95, 96] estas distancias estarían relacionadas con zonas localizadas dentro del polímero que presentan densidades de materia diferentes.

En la figura 43 se muestran los diagramas de difracción de doble logaritmo de las muestras de micropartículas reticuladas al 1,5 % con y sin GOx en su interior.



**Fig. 43** Doble logaritmo de los espectros de difracción de las micropartículas de poli(acrilamida) al 1,5 % • micropartículas vacías, ○ micropartículas con GOx en su interior.

Los espectros de las micropartículas de 1,5 % y 0,25 % de poli(acrilamida) vacías son muy similares, no obstante, al comparar las micropartículas al 1,5 % con y sin GOx, existen claras diferencias. En las micropartículas al 1,5 % de reticulación, en la región de ( $q \geq 1/\xi_1$ ) se obtienen unos valores  $\xi_1 = 128\text{\AA}$  y  $\xi_2 = 4,5\text{\AA}$  los cuales por otra parte son muy similares a los obtenidos en la muestra con inferior grado de reticulación. Para  $q \leq 1/\xi_1$  la dependencia de  $I(q)$  con  $q$  es dada por  $I(q) \sim q^{-2,7}$ . Estos datos parecen indicar que las longitudes de correlación así como el exponente de  $q$  disminuye al incrementar el grado de reticulación. Takahashi y col [116] encontraron una relación entre la fracción de volumen del polímero en equilibrio  $\phi_{eq}$  y la distancia de correlación ( $\xi \sim \phi_{eq}^{-0,79}$ ). Nuestros resultados se ajustan con las predicciones porque  $\phi$  aumenta cuando el grado de reticulación aumenta desde 0,25 % hasta 1,5 %. El perfil de la exponencial ampliada no fue observado en las muestras estudiadas en ninguna región de  $q$ . A muy bajas  $q$  la intensidad se describe por:  $I(q) \sim q^{-\alpha}$ , la diferencia observada en  $\alpha$  parece indicar que la interfase llega a ser más difuminada en los microgeles con GOx ( $\alpha = 4,0$ ) que en los microgeles sin enzima ( $\alpha$  entre 2,7 y 3,0). La figura 44 muestra la representación de Ornstein-Zernike de las micropartículas de poli(acrilamida) con 1,5 % de grado de reticulación con GOx en su interior.

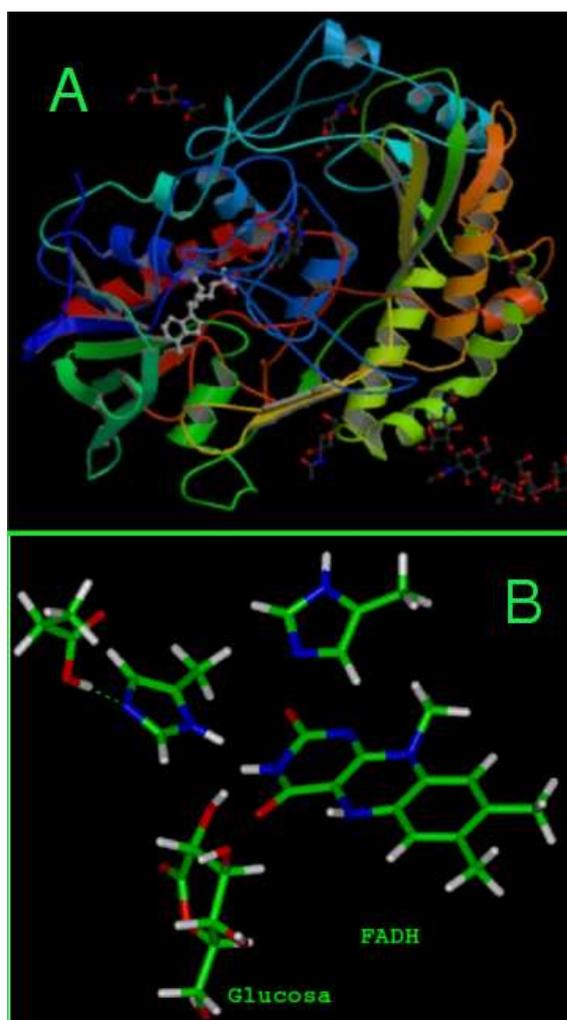


**Fig. 44** Representación de Ornstein-Zernike del espectro de difracción de las micropartículas de poli(acrilamida) con 1,5% de grado de reticulación con GOx en su interior.

De la representación anterior se obtienen las distancias de correlación de  $\xi_1 = 64,5 \text{ \AA}$ ,  $\xi_2 = 4,3 \text{ \AA}$  y  $\xi_a = 11,5 \text{ \AA}$ . Las distancias correspondientes a  $\xi_1$  y  $\xi_2$  tienen sus homónimas en los geles vacíos, sin embargo la inmovilización del enzima en el interior de las micropartículas produce una distorsión de la red polimérica, dando lugar a una tercera distancia de correlación de  $11,5 \text{ \AA}$ .

### 3.1.3. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli(acrilamida)

Todo biosensor consta de dos partes, el transductor y el componente biológico. El biosensor propuesto en este trabajo pertenece al grupo de los biosensores amperométricos. Este se basa en la transformación de la  $\beta$ -D-glucosa en  $\delta$ -gluconato lactona y la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno. Esta reacción es catalizada por la acción de un enzima, GOx de *Aspergillus niger*, figura 45 A.



**Fig. 45** A; Estructura proteica de una subunidad monomérica de la GOx de *Aspergillus niger*. B; Configuración del FADH durante la oxidación de la glucosa.

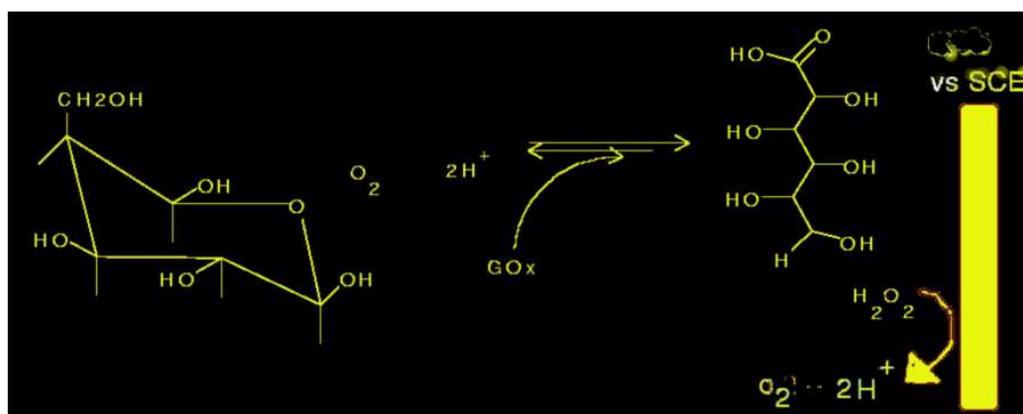
La figura 45 B muestra una subunidad catalítica de las dos que constituyen la GOx. Este enzima de peso molecular 160 KDalton tiene en su estructura un grupo FADH con capacidad rédox que está fuertemente ligado y que es el constituyente esencial del centro catalítico. La disociación de los homodímeros que forman el enzima es posible solo bajo condiciones desnaturalizantes lo que va acompañando con la pérdida del coenzima FAD [97].

Este enzima se ha caracterizado por su gran estabilidad tanto química como física, lo cual ha sido atribuido a la existencia de residuos de manosa en la periferia de la enzima que la estabilizan.

La GOx pertenece al grupo de las oxidorreductasas y media en la oxidación de la glucosa gracias a la participación de una molécula de *FADH* de su centro activo en el proceso de oxidación. Este cofactor frecuente en gran cantidad de enzimas oxidoreductoras actúa como intermediario en la oxidación de una molécula de glucosa cediendo posteriormente los electrones al  $O_2$  y produciendo  $H_2O_2$ . La reacción global sigue una cinética bisustrato ordenada de tipo ping pong [87, 97].

En la figura 45b se muestra la estructura del centro activo del enzima formado por una unidad de *FADH* y varios residuos de histidina y tiroxina que intervienen en el aporte de  $H^+$  durante la oxidación de la molécula de glucosa.

En el biosensor amperométrico el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) generado en la reacción enzimática es posteriormente oxidado en un electrodo de platino a un potencial de +0,6V vs SCE produciendo  $O_2$ ,  $H^+$  y una intensidad de corriente proporcional a la concentración de  $H_2O_2$  del medio.



**Fig.46** Reacción de oxidación de la glucosa catalizada por la GOx en las cercanías del electrodo y la oxidación del  $H_2O_2$  en su superficie.

La figura 46 muestra un esquema de la reacción global en el electrodo. Una vez oxidado el  $H_2O_2$  en el electrodo de platino, se genera un corriente eléctrica cuya intensidad viene definida por la ecuación :

$$I_k = \frac{nFAdk_c[E_0][S]}{2(Km + [S])} \quad (3.10)$$

Donde n es el número de electrones que intervienen en la reacción, F es la constante de Faraday, d es el espesor de la capa enzimática,  $k_c$  es la constante catalítica del enzima,  $[E_0]$  es la concentración de enzima y Km es la constante de Michaelis. Esta ecuación establece que la intensidad de corriente generada tiene un control cinético por parte de la reacción enzimática. A partir de esta ecuación se obtiene que la

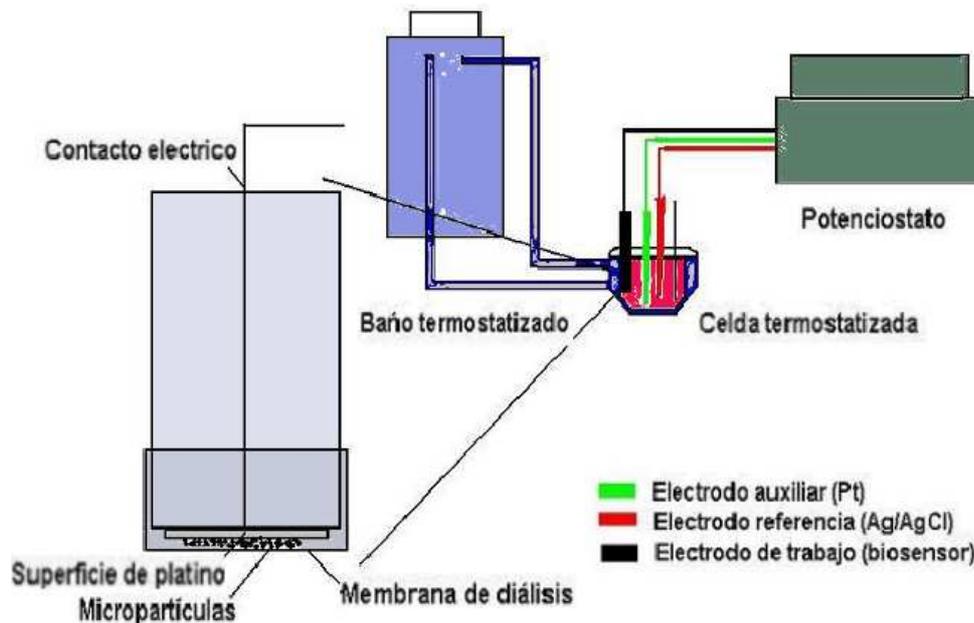
intensidad de corriente máxima ( $i_{max}$ ) obtenida cuando  $[S] \gg K_M$  es:

$$i_{max} = \frac{nFAk_c[E_0]}{2} \quad (3.11)$$

$$i_k = \frac{i_{max} \times [S]}{K_M} \quad (3.12)$$

La ecuación anterior muestra equivalencia de la intensidad de la corriente generada con la concentración de sustrato en un biosensor amperométrico cuando  $[S] < K_M$ . Como se puede observar esta ecuación define una línea recta que establece el rango de linealidad del biosensor.

Para realizar las medidas en nuestro biosensor utilizamos un transductor formado por un electrodo de platino sobre el que se ha inmovilizado el material biológico, micropartículas de poli(acrilamida) con GOx en su interior. El conjunto micropartículas electrodo es fijado mediante una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 12.000 daltons. En la figura 47 se muestra un esquema del montaje del biosensor.



**Fig. 47** Esquema del montaje de un biosensor acoplado a un potenciostato y a un baño termostatzado.

Como se puede observar en la figura 47, la celda electroquímica se encuentra acoplada a un baño termostatzado con el que se puede mantener la temperatura constante entre  $1^{\circ}C$  y  $50^{\circ}C$ .

### 3.1.4. Factores que influyen en la respuesta amperométrica del biosensor de glucosa

Cuando se prepara un biosensor es importante conocer la influencia de distintos factores experimentales en la respuesta del mismo. Con este propósito se han estudiado los siguientes parámetros:

1. Grado de reticulación de las micropartículas poliméricas.
2. pH de la disolución en la que se encuentra el electrodo.
3. Temperatura.
4. Carga enzimática expresada como la cantidad de enzima inmovilizada en el interior de las micropartículas.
5. Carga enzimática expresada como la cantidad de micropartículas inmovilizada en la superficie del electrodo.
6. Incorporación de carga negativa a las micropartículas.

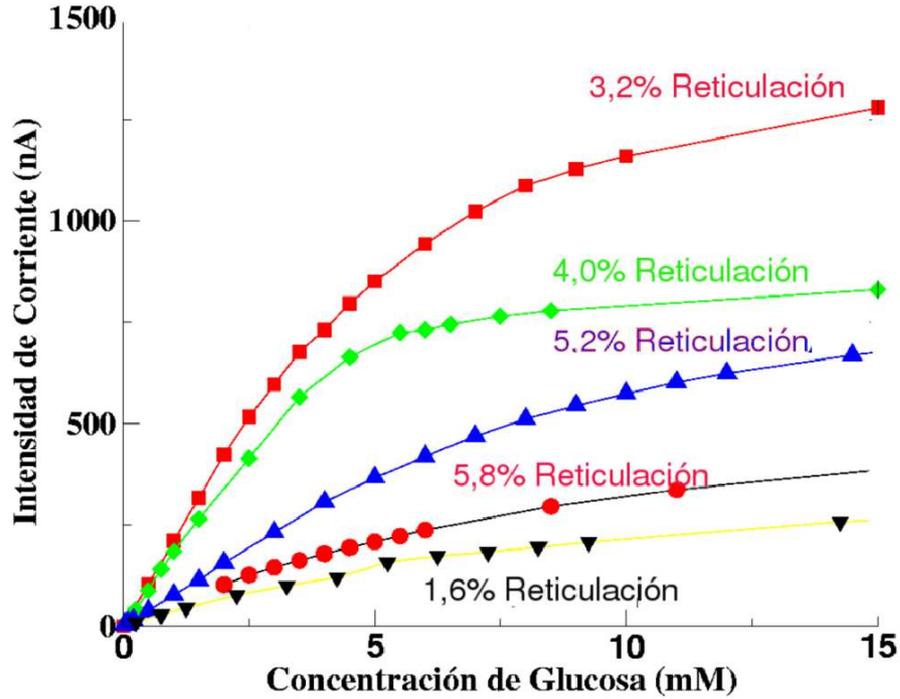
El estudio de cada uno de estos factores permite conocer los límites del biosensor y el efecto sobre la cinética enzimática y electroquímica. Con estos datos podemos seleccionar las condiciones óptimas que generen la máxima respuesta y la más rápida.

#### Influencia del grado de reticulación de las micropartículas

El grado de reticulación es un factor clave que permite al microgel inmovilizar el enzima, manteniendo una difusión lo suficientemente buena como para que, tanto el sustrato como el producto de la reacción, difundan rápidamente, dando así tiempos de respuesta cortos. Para realizar este estudio se sintetizaron micropartículas de poli(acrilamida) con seis grados de reticulación distintos 0,7; 1,6; 3,2; 4,0; 5,2 y 5,8. Con cada uno de estos tipos de micropartículas se prepararon biosensores en los que se evaluó la respuesta a la glucosa.

Las adiciones de glucosa se realizaron sobre una disolución reguladora de fosfato sódico a pH 6 0,1M a 25°C. En esta disolución se sumerge el biosensor formado por 3mg de micropartículas, el cual se mantenía a un potencial de  $E = +0,6V$  vs SCE durante el tiempo necesario hasta obtener una corriente de fondo constante. Alcanzada la estabilización de la corriente, se añaden alícuotas sucesivas de glucosa, generando como resultado incrementos en la intensidad de corriente. A partir de estas curvas de intensidad de corriente vs. concentración de glucosa se calcularon los parámetros que definen la cinética enzimática,  $K_m^{ap}$  y  $V_{max}^{ap}$ .

En la figura 48, se observa como a bajos grados de reticulación se obtienen bajas intensidades de corrientes, debido a la presencia de menos centros activos de enzima por micropartícula. Este resultado se explicaría si consideramos que un grado de reticulación del 1,6% genera un tamaño de poro lo suficientemente grande como para que el enzima pueda salir de la micropartícula. Este fenómeno se ha podido observar al medir la actividad enzimática en los sobrenadantes de lavado que estas micropartículas producen tras la síntesis.



**Fig.48** Curvas de calibrado de biosensores preparados con micropartículas con diferentes grados de reticulación.

La pérdida de enzima durante el proceso de lavado se ve más pronunciado cuando el grado de reticulación es 0,7% ya que esto origina poros aún mayores. Sin embargo cuando el grado de reticulación aumenta hasta 3,2% nos encontramos ante la situación contraria, al aumentar el número de enlaces cruzados en la red polimérica, el tamaño de poro de las micropartículas se reduce significativamente, incrementándose la cantidad de GOx inmovilizada en el interior, aumentando así la intensidad de corriente. Este aumento de la intensidad de corriente llega a un máximo en las micropartículas con grado de reticulación 3,2%, a partir de este punto incrementos en la reticulación da lugar a redes poliméricas más rígidas, que pueden provocar impedimentos estéricos al enzima, lo que se traduce en un descenso de la cinética catalítica del enzima. A este efecto hay que sumar el aumento de la barrera difusional para el soluto resultado del descenso en el tamaño del poro de la matriz polimérica. Consecuencia de esto es el descenso de la  $V_{max}^{ap}$ , no por la pérdida de enzima sino por la menor capacidad catalítica, debida al impedimento estérico así como por la menor disposición de sustrato por el enzima. Con el fin de evaluar la desviación de las curvas de calibración de los biosensores respecto a una cinética de Michaelis-Menten [148], se ha calculado el índice de Hill a partir de la expresión:

$$i_k = \frac{i_{max} \times [S]^h}{K_m + [S]^h} \quad (3.13)$$

Donde h es el índice de Hill, [S] es la concentración de sustrato,  $K_m$  es la constante de Michealis-menten,  $i_{max}$  la intensidad de corriente máxima generada e  $i_k$  la intensidad de corriente generada.

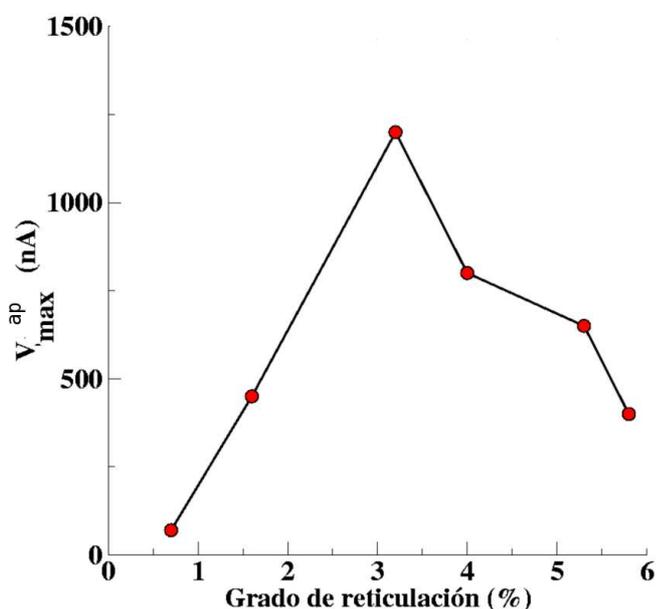
La tabla 3 muestra los resultados de dichos ajustes.

**Tabla 3.** Índice de Hill de las micropartículas de poli(acrilamida).

Grado de Reticulación	índice de Hill
1,6	1,25
3,2	1,19
4,0	1,11
5,2	0,98
5,8	1,20

Como se puede observar en la tabla el índice de Hill no sigue una tendencia definida en función del grado de reticulación, aproximándose al valor 1,2 en la mayoría de los casos. Este valor cercano a la unidad indica que el enzima inmovilizado sigue la cinética de Michaelis-Menten. Utilizando la ecuación 3.13 es posible extraer el valor de  $V_{max}^{ap}$  y  $K_m$  de los ajustes anteriores.

La figura 49 muestra la representación de  $V_{max}^{ap}$  en función del grado de reticulación de las micropartículas.



**Fig.49**  $V_{max}^{ap}$  de las micropartículas en función del grado de reticulación.

En esta figura se puede ver como el incremento en la reticulación genera a partir del valor de 3,2%, un descenso en la  $V_{max}^{ap}$ . Una forma de estudiar la eficacia de la reacción enzimática es calculando la constante específica. Esta constante  $K_{esp}$  nos informa de la probabilidad de que una molécula de sustrato encuentre un enzima y que ésta catalice la reacción [87]. En el caso de enzimas inmovilizadas en redes poliméricas reticuladas esta constante informa de la difusión del sustrato hacia el centro catalítico [71].

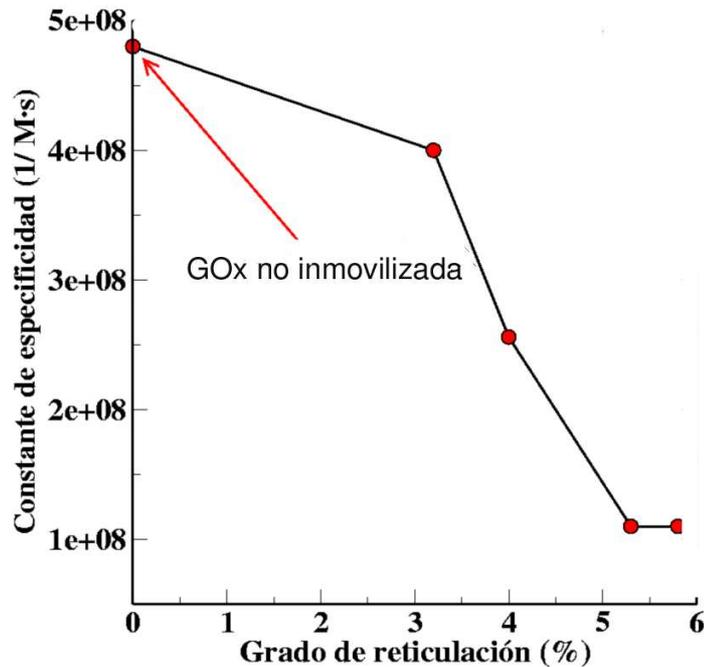
$$K_{esp} = \frac{K_{cat}}{K_m^{ap}} \quad (3.14)$$

Donde  $K_{esp}$  es la constante de especificidad de la reacción,  $K_{cat}$  es la constante catalítica de la reacción enzimática y  $K_m^{ap}$  es la  $K_m$  aparente de la reacción enzimática. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que a partir del grado de reticulación

3,2% no se pierde enzima durante la inmovilización, manteniéndose la cantidad de enzima inmovilizada constante se podría comparar la  $K_{esp}$  entre los grados de reticulación superiores utilizando la siguiente expresión:

$$K_{esp} = \frac{V_{max}}{[E_0] K_m^{ap}} \quad (3.15)$$

La figura 50 representa la  $K_{esp}$  del enzima inmovilizado en las micropartículas en función del grado de reticulación.

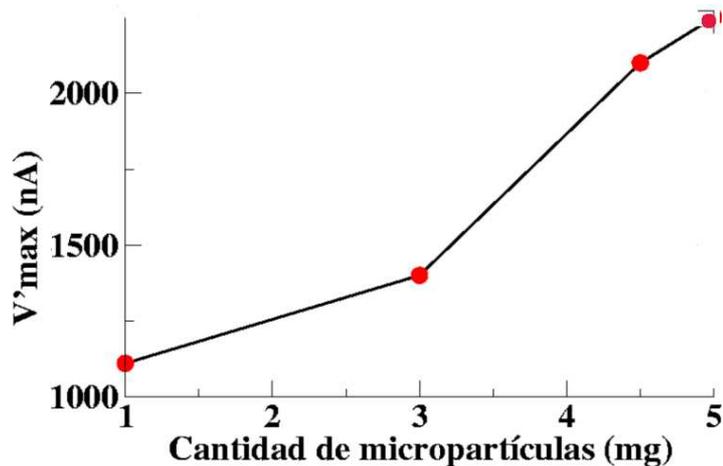


**Fig. 50** Especificidad catalítica en función del grado de reticulación.

Al representar la  $K_{esp}$  de la enzima inmovilizada se puede observar como a partir del grado de reticulación de 3,2% esta constante comienza a decrecer lo que indica que existe un descenso en la eficacia de la reacción, resultado quizás de un incremento en la rigidez de la matriz, que restringe los movimientos de la enzima, dificultando que ésta entre en contacto con el sustrato. Por este motivo se ha elegido el grado de reticulación de 3,2 como el óptimo en la síntesis de micropartículas con GOx en su interior.

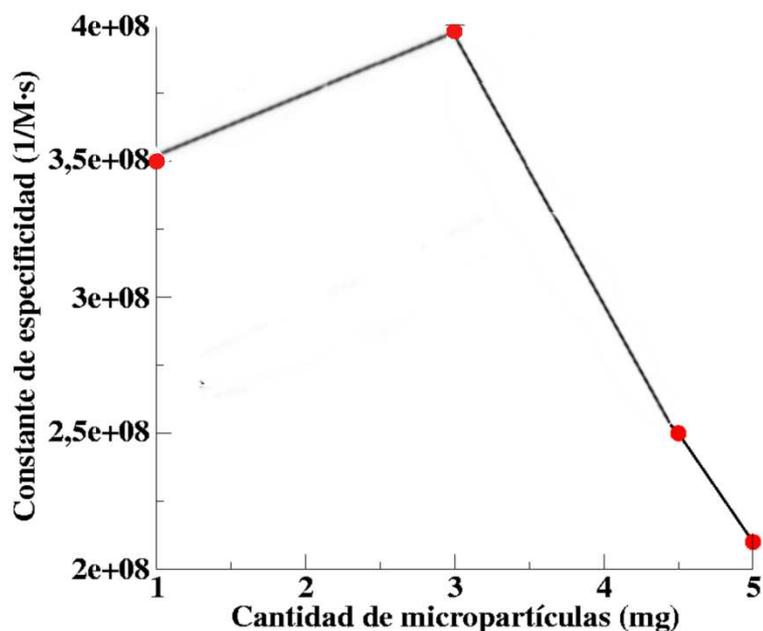
### Influencia de la cantidad de micropartículas.

Otro factor que es necesario controlar en el desarrollo de un biosensor es la cantidad de micropartículas utilizadas en su preparación. Con este propósito se prepararon biosensores con 1,0; 3,0; 4,5 y 5,0 mg de micropartículas con grado de reticulación 3,2%, en condiciones idénticas a las anteriores. La figura 51 representa las  $V_{max}^{ap}$  obtenidas de las curvas de calibración de los biosensores en función de la cantidad de micropartículas inmovilizadas.



**Fig.51**  $V_{max}$  de los biosensores preparados con diferentes cantidades de micropartículas.

Como se puede observar la  $V_{max}^{ap}$  aumenta al incrementar la cantidad de micropartículas en la superficie del electrodo. Este aumento es debido al incremento de centros catalíticos en el biosensor.

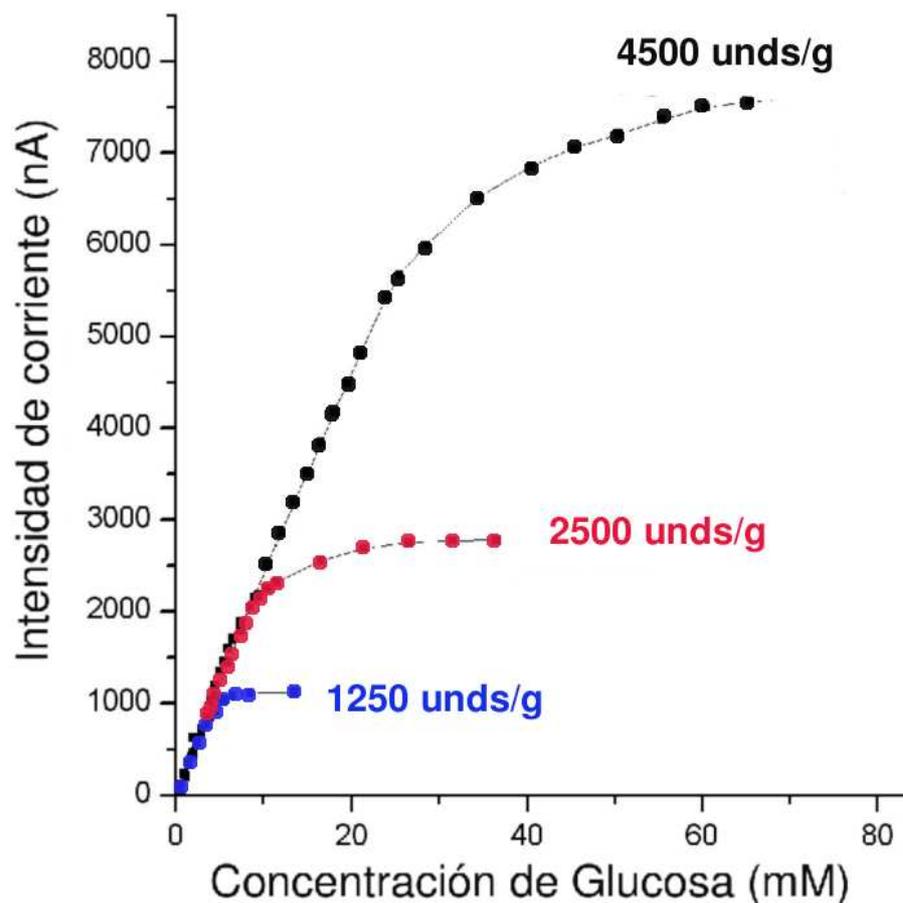


**Fig. 52** Constante de especificidad de los biosensores preparados con diferentes cantidades de micropartículas.

Sin embargo la  $K_{esp}$  sufre descenso cuando se utilizan cantidades superiores a 3mg, tal y como se puede apreciar en la figura 52. Esto se debe a que la capa de micropartículas crea una barrera difusional que disminuye la entrada de sustrato al interior. Por este motivo se ha elegido una carga de 3mg de micropartículas para el diseño de los biosensores.

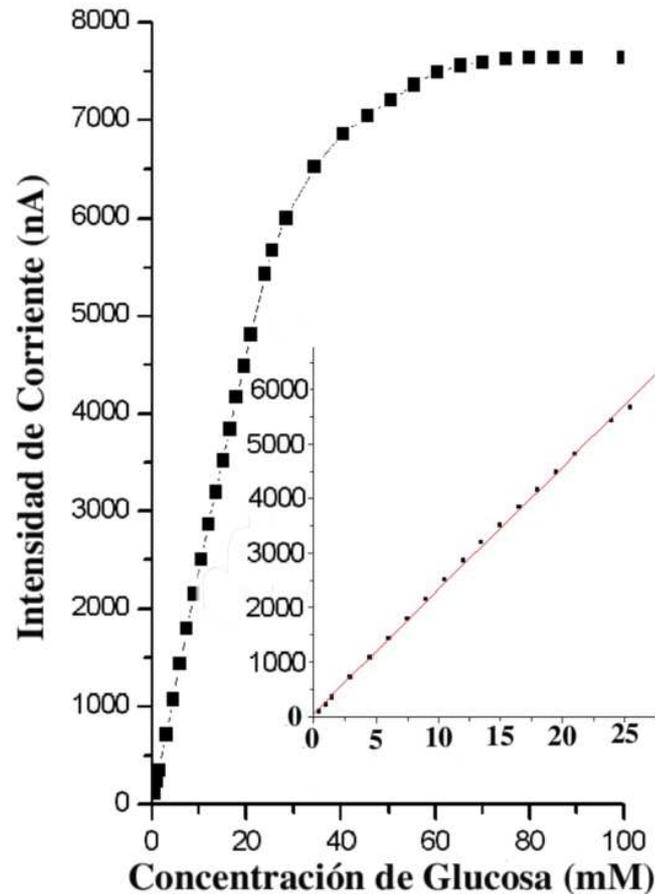
### Influencia de la carga enzimática en las micropartículas de poli(acrilamida)

Con el fin de obtener un biosensor con un amplio rango de linealidad, se han preparado, micropartículas de poli(acrilamida) en las que se han inmovilizado diferentes concentraciones de enzima durante la síntesis. Las concentraciones de GOx empleadas durante la síntesis de las micropartículas son: 1250UI/g, 2500UI/g y 4500UI/g. La figura 42 muestra las curvas de calibración de los biosensores preparados con 3mg de micropartículas en las que se han inmovilizado diferentes cantidades de GOx.



**Fig. 53** Curva de calibración de diferentes biosensores con distinto contenido de GOx en el interior de las micropartículas.

Como se observa en la figura 53, al aumentar la cantidad de enzima, aumenta  $V_{max}$ , incrementando también el rango de linealidad de los biosensores, llegando hasta 25mM de glucosa en el caso de las micropartículas con mayor cantidad de GOx en su interior. Por este motivo se han seleccionado estas micropartículas para preparar los biosensores. Debido a su amplio rango de linealidad pueden ser utilizados en la determinación de glucosa en sueros diabéticos en los que la concentración puede llegar hasta 20mM. La figura 54 muestra la curva de calibrado del biosensor preparado con 3mg de micropartículas, con grado de reticulación 3,2% y carga enzimática 4500 UI/g.



**Fig. 54** Curva de calibración del biosensor preparado con 3mg de micropartículas, con grado de reticulación 3,2 % y carga enzimática 4500 UI/g .

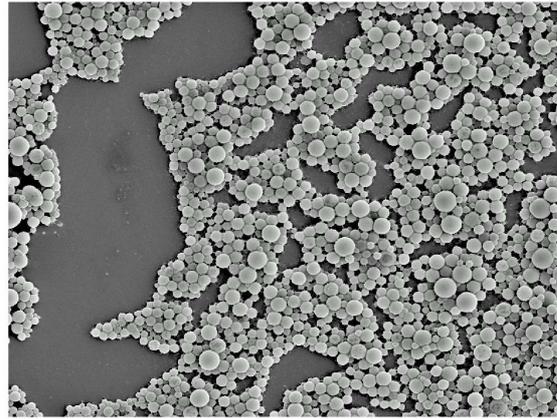
El intervalo de linealidad del biosensor anterior está comprendido entre 0,09mM y 25mM, con un límite de detección S/R=3 de 0,03mM. La ecuación que define este biosensor es:

$$i_{(nA)} = 73,98_{(nA)} + 225_{(nA/mM)} \times x_{(mM)} \quad (3.16)$$

La ecuación que define la recta presenta un coeficiente de correlación de 0,9994.

### **Incorporación de carga negativa en las micropartículas.**

Para poder utilizar estos biosensores en las determinaciones de glucosa en suero, es necesario eliminar interferencias causadas por componentes de la sangre como el ácido úrico y el ácido ascórbico. Estas sustancias se oxidan a potenciales inferiores a 0,6V vs SCE dando una corriente que interfiere con la glucosa. Para poder eliminar estos interferentes, se ha incorporado carga negativa a las micropartículas mediante la sustitución de una cantidad determinada de acrilamida por ácido acrílico, manteniendo el resto de los parámetros, tales como agente reticulante, pH de la solución, etc constantes. La figura 55 muestra una fotografía SEM de las micropartículas con un 50 % de ácido acrílico.



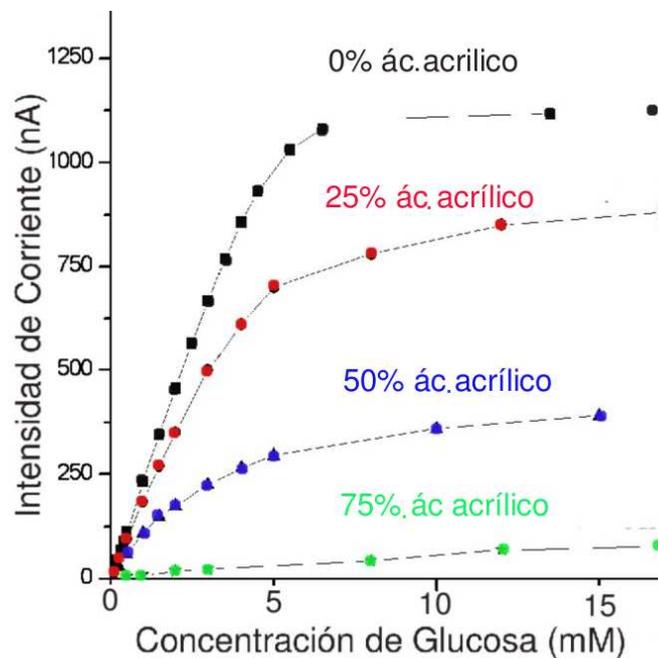
100  $\mu\text{m}$

**Fig. 55** Micropartículas de poli (acrilamida-ácido acrílico) en un 50 %, con grado de reticulación 3,2 % y GOx en su interior.

Como se puede observar en la micrografía anterior las micropartículas sintetizadas mantienen una forma muy similar a las de poli(acrilamida). Con el fin de obtener un sistema sin interferentes, se han sintetizado varios tipos de micropartículas en los que se ha sustituido cantidades diferentes de acrilamida por ácido acrílico. Definiéndose el porcentaje de ácido acrílico como:

$$AA\% = \frac{AA_g}{AA_g + AC_g} \times 100 \quad (3.17)$$

Donde AA % es el porcentaje de ácido acrílico,  $AA_g$  y  $AC_g$  son las cantidades en gramos del ácido acrílico y acrilamida respectivamente, utilizados en la síntesis.



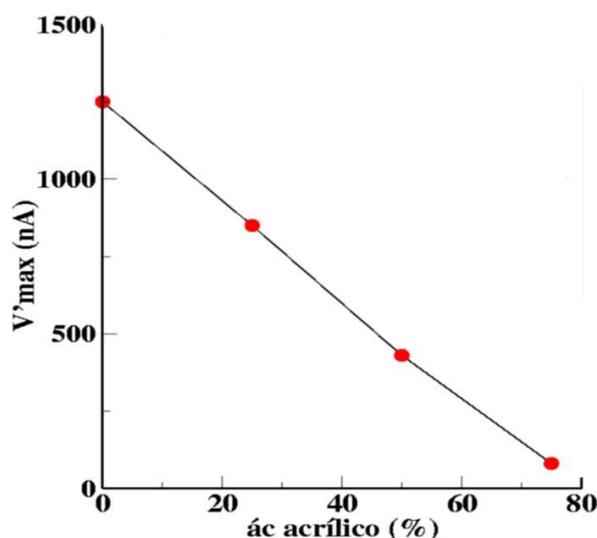
**Fig. 56** Curvas de calibrado de biosensores preparados con 3mg de micropartículas con diferentes cantidades de ácido acrílico en su interior.

El resultado de la síntesis son micropartículas con diferentes porcentajes de ácido acrílico y en consecuencia, diferente carga neta negativa. Con estas micropartículas se han preparado biosensores sobre los que se ha evaluado mediante curvas de calibración las posibles variaciones que sobre la actividad enzimática produce la incorporación del ácido acrílico (figura 56). La tabla 4 muestra el valor del índice de Hill para cada una de las curvas.

**Tabla 4** Índice de Hill de las micropartículas de poli(acrilamida-ácido acrílico).

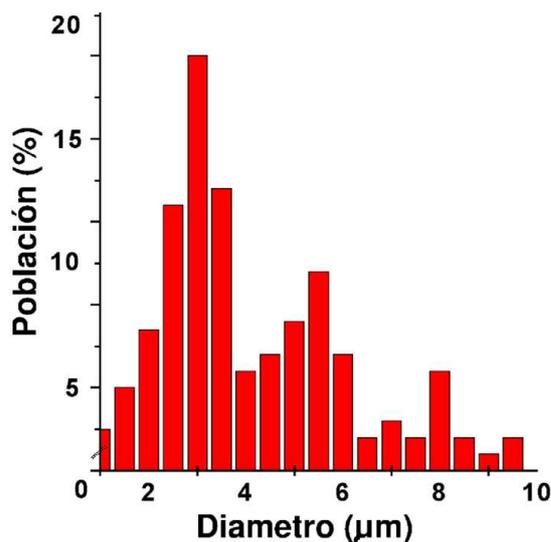
Porcentaje de ácido acrílico	índice de Hill
0 %	1,19
25 %	1,4
50 %	1,05
75 %	0,98

La tabla 4 muestra que el índice de Hill, de las micropartículas con ácido acrílico es  $\sim 1$ , característico de un comportamiento cinético de Michaelis-Menten a excepción de las micropartículas con un 25 % de ácido acrílico, que presentan una mayor desviación.



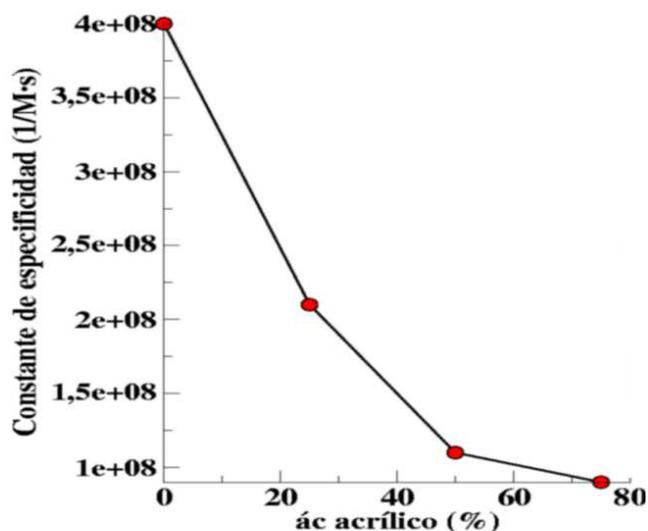
**Fig. 57** Representación de  $V'_{max}^{ap}$  obtenida en los biosensores con micropartículas con diferentes concentraciones de ácido acrílico, grado de reticulación 3,2% y 1250 UI/g de GOx.

De las curvas de calibración de los biosensores se observa que la  $V'_{max}^{ap}$  del biosensor disminuye, a medida que aumenta la concentración de ácido acrílico en las micropartículas. Tal y como se representa en la figura 57. Esta disminución de  $V'_{max}^{ap}$  puede ser debida a la capacidad de los grupos carboxílicos del ácido acrílico para formar redes más hidratadas, ya que aumentaría la  $\Delta G_i$  como consecuencia del aumento de las interacciones electrostáticas, tal y como predice la teoría de Flory-Huggins y comprobada en el caso de geles de poli(acrilamida-ác acrílico) por Kayaman y col [72, 75]. Este mayor hinchamiento podría llevar a un aumento en el tamaño de la micropartícula. Con el fin de comprobar este fenómeno se ha estudiado el tamaño de las micropartículas con un 50 % de ácido acrílico mediante un contador de partículas.



**Fig. 58** Distribución de tamaños de las micropartículas con un 50 % de ácido acrílico grado de reticulación 3,2% y 1250 UI/g de GOx.

La figura 58 muestra la distribución de tamaños de las micropartículas. Aquí se puede observar la presencia de tres poblaciones claramente diferenciadas con unos tamaños de 3Å, 5,5Å y 8Å respectivamente. Al comparar estas micropartículas con las preparadas con poli(acrilamida) se aprecia un desplazamiento del tamaño hacia valores mayores, confirmando el incremento del tamaño como consecuencia de la introducción de la carga negativa en la estructura. Este incremento en el tamaño de las micropatículas puede influir en la señal medida, disminuyendo la intensidad de corriente como consecuencia de un incremento del espacio del volumen en el que se distribuye el enzima inmovilizado. Como consecuencia la probabilidad de que el sustrato entre en contacto con el enzima inmovilizado disminuye tal y como se puede observar al calcular la  $K_{esp}$ .

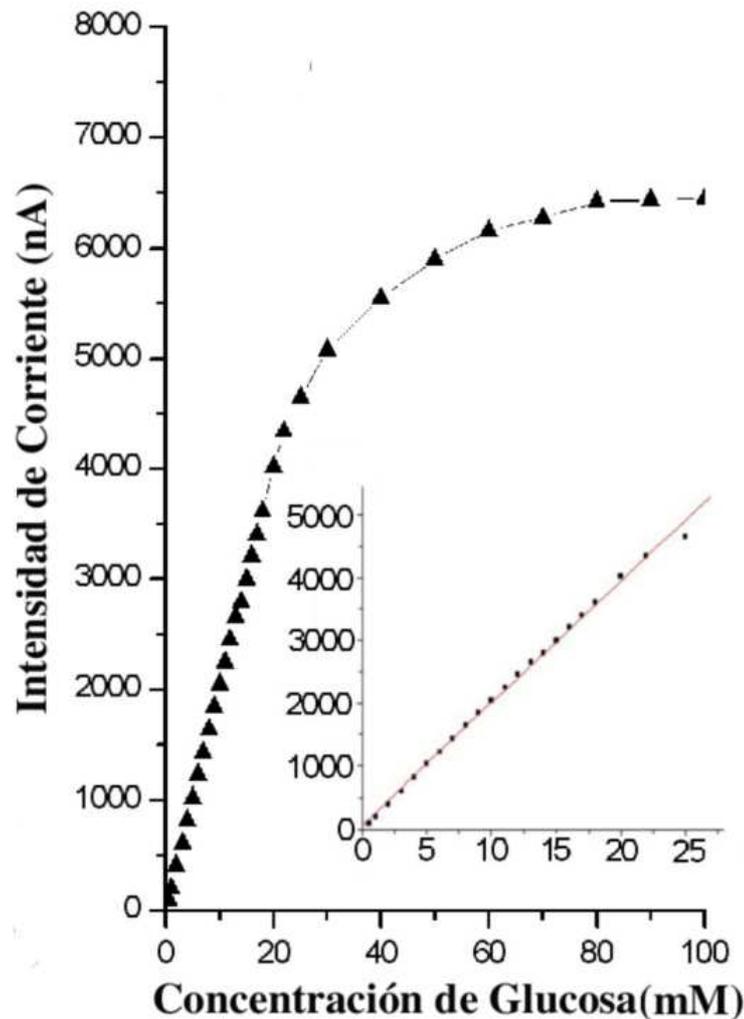


**Fig. 59** Representación de la  $K_{esp}$  de micropartículas con un 50 % ácido acrílico, grado de reticulación 3,2% y 1250 UI/g de GOx.

En la figura 59 se representa la  $K_{esp}$  en función del porcentaje de ácido acrílico en la síntesis. Como se observa, el aumento en el porcentaje de ácido acrílico en el interior de las micropartículas produce un descenso pronunciado de la  $K_{esp}$ , consecuencia del descenso en la probabilidad de encontrarse el enzima con el sustrato. No obstante, debido a que a partir de una concentración del 50% de ácido acrílico los biosensores carecen de señal a los interferentes, se ha elegido ésta como la óptima para la preparación de las micropartículas.

### Influencia de la carga enzimática en las micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico)

Como en el caso anterior y con el fin de incrementar al máximo el límite de detección, se ha incrementado la cantidad de enzima dentro de las micropartículas con un 50% de ácido acrílico, hasta una concentración de 4500 UI/g. La respuesta del biosensor obtenido se muestra en la figura 60.

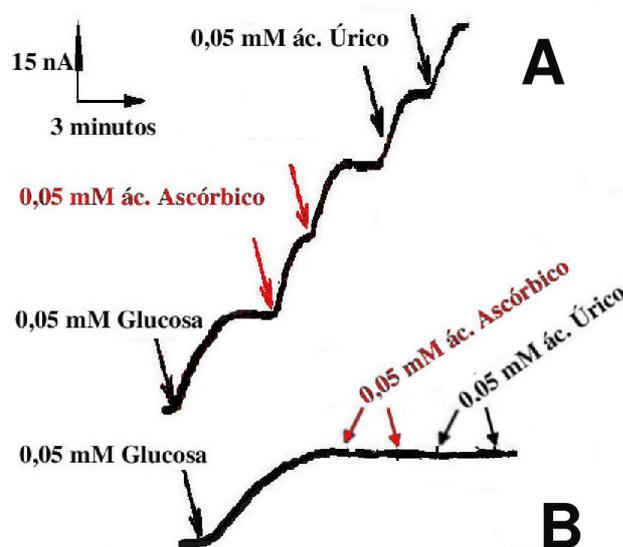


**Fig. 60** Curva de calibración de biosensore preparados con 3mg de micropartículas con un 50% de ácido acrílico y carga enzimática 4500 UI/g.

El intervalo de linealidad del biosensor anterior está comprendido entre 0,09mM y 25mM con un límite de detección S/R=3 de 0,03mM al igual que el anterior. La ecuación que define este biosensor es:

$$i_{(nA)} = 65,8_{(nA)} + 194_{(nA/mM)} \times x_{(mM)} \quad (3.18)$$

La ecuación que define la recta presenta un coeficiente de correlación de 0,998. Como se puede observar el biosensor con carga negativa presenta una menor sensibilidad a la glucosa que su homónimo de poli(acrilamida), sin embargo el biosensor de poli(acrilamida-ácido acrílico) a diferencia del anterior, tiene mayor selectividad al eliminar las interferencias producidas por sustancias como el ácido úrico y ácido ascórbico tal y como se muestra en la figura 61.



**Fig. 61** a) Respuesta del biosensor de micropartículas de poli(acrilamida), b) respuesta del biosensor con micropartículas con 50 % ácido acrílico.

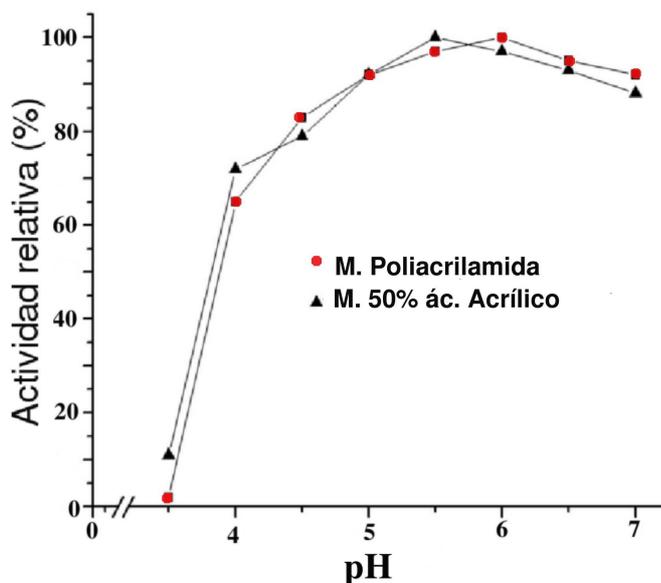
### Influencia del pH

Las enzimas, como todas las proteínas, son muy sensibles al pH. La mayoría son activas dentro de intervalos de pH estrechos, normalmente entre 5 y 9. Esto se debe a que el pH puede alterar los siguientes factores:

1. La unión de la enzima al sustrato.
2. La actividad catalítica del enzima.
3. La ionización del sustrato.
4. La variación de la estructura proteica.

Para la mayoría de las reacciones enzimáticas la dependencia de las  $V_{max}$  respecto al pH muestra forma de campana. Esta curva refleja el estado de ionización de ciertos aminoácidos que deben encontrarse en un estado de ionización específico, para ser enzimáticamente activos.

En este trabajo el estudio del pH sobre la actividad de los biosensores se realizó siempre con una solución reguladora de acetato-fosfato 0,1M, para no cambiar la naturaleza de los aniones que pueden interaccionar de formas diferentes con el enzima y/o con el sustrato. Los pHs ensayados fueron: 3,50; 4; 4,5; 5; 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. Se estudió la influencia del pH en dos biosensores, uno preparado por 3mg de micropartículas de poli(acrilamida) y otro biosensor preparado con 3mg de micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico), ambos con grado de reticulación  $\chi=3,2\%$ . Las medidas se hicieron a 25°C, a un potencial  $E=+0,6$  V vs ECS, midiendo la intensidad de corriente generada a saturación de glucosa en el estado estacionario.



**Fig. 62** Actividad relativa en función del pH del biosensor de micropartículas de poli(acrilamida) y micropartículas con 50 % de ácido acrílico.

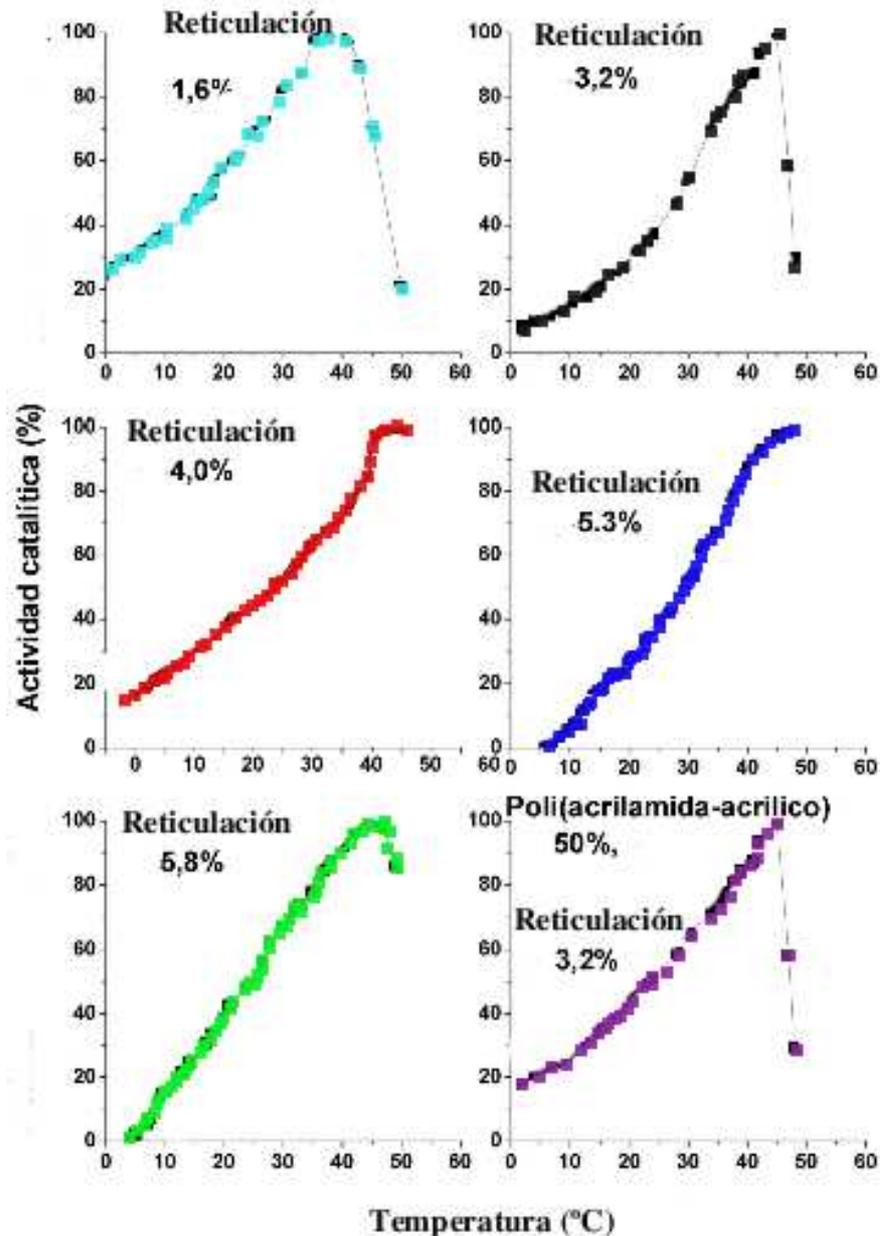
En la figura 62 se puede observar como el pH 6,0 es el de máxima actividad para las micropartículas de poli(acrilamida), mientras que es de 5,5 para las micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico). Estas pequeñas diferencias de los pHs de máxima actividad se atribuyen al diferente ambiente que rodea al enzima dentro de la matriz. En el caso de las micropartículas de poli(acrilamida) el pH está levemente desviado del pH óptimo para el enzima libre, que es de 5,5. En el caso de las micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico) el pH óptimo coincide con el del enzima libre, lo cual podría indicar en este caso y debido a la mayor hidratación de los geles, que el enzima inmovilizado está en unas condiciones más parecidas a las del enzima libre.

### Influencia de la temperatura

La temperatura tiene una gran influencia en la cinética de cualquier reacción química. Cuando se trata de una reacción enzimática la temperatura tiene un efecto adicional ya que alcanzado un valor determinado, la proteína comienza a desnaturalizarse, es decir, su estructura se modifica y pierde la capacidad catalítica. Todo

esto hace imprescindible el estudio del efecto de la temperatura en el comportamiento del biosensor.

Este estudio se llevó a cabo termostatazando la celda electroquímica mediante una camisa unida a un baño termostatazador. Se tomaron 3mg de micropartículas de un grado de reticulación  $\chi=3,2\%$ , las adiciones de glucosa se realizaron sobre una solución reguladora de fosfato-acetato 0,1 M y pH 6,0, en la que se burbujeaba  $O_2$  con el fin de mantener su concentración constante. Las medidas se hicieron a un potencial  $E=+0,6$  V vs ECS. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 63, aquí se representa la actividad enzimática relativa en función de la temperatura.



**Fig. 63** Representación de la actividad relativa de las muestras de poli(acrilamida) con grados de reticulación a)1,6 b)3,2 c)4,0 y d)5,3 en función de la temperatura.

Como se puede observar en la figura 63 y en la tabla siguiente, la actividad máxima relativa se va desplazando hacia temperaturas superiores a medida que aumenta el grado de reticulación de las micropartículas. Esto se cree que es debido al incremento en la rigidez del polímero, que restringe la movilidad del enzima, protegiéndola de la desnaturalización. En el caso de las micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico) la temperatura a la que se alcanza la actividad relativa máxima se encuentra cercana a 44 °C, temperatura similar a la de las micropartículas con grado de reticulación 3,2 %.

**Tabla 5** Temperatura de actividad relativa máxima en función del grado de reticulación.

Grado de reticulación	1,6 %	3,2 %	4,0 %	5,3 %	5,8 %
T (°C) de actividad relativa máx.	38°C	44°C	46°C	48°C	47°C

Utilizando la expresión de Arrhenius, se puede obtener la energía de activación  $E_a$  de la reacción enzimática.

$$K_c = A \times e^{-E_a/RT} \quad (3.19)$$

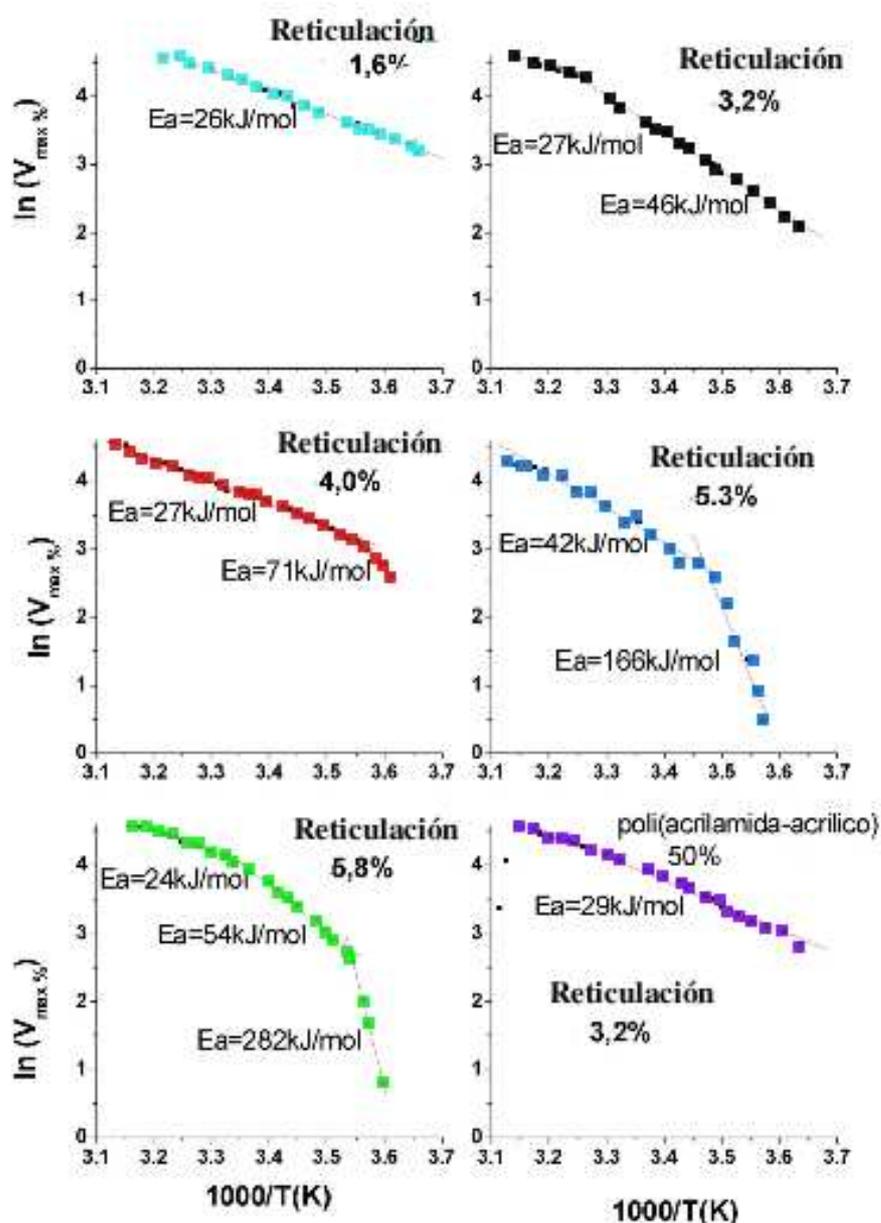
Donde  $K_c$  es la constante cinética de la reacción, A es el factor relacionado con la frecuencia de los choques de las moléculas,  $E_a$  es la energía de activación de la reacción, R es la constante de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin. La expresión anterior puede ser modificada a la 3.22, para el caso de reacciones enzimáticas.

$$V_{max} = K_{cat}[E_0] \quad (3.20)$$

$$\ln(V_{max}) = \ln(E_0) + \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (3.21)$$

$$\ln(V_{max}) = \ln(K) - \frac{E_a}{RT} \quad (3.22)$$

En la figura 64 se muestran las representaciones de Arrhenius de los biosensores en función del grado de reticulación de las micropartículas. En estas representaciones se puede observar, como en la zona correspondiente a bajas temperaturas, la  $E_a$  obtenida a partir de las pendientes aumenta a medida que aumenta el grado de reticulación de las partículas. En este rango de temperaturas los fenómenos que afectan a la  $E_a$  son básicamente debidos a alteraciones en la cinética enzimática, ya que en este rango de temperaturas, la difusión es tan baja que afecta de igual forma a todas las muestras analizadas [71]. Esto indicaría que el polímero está, mediante impedimento estérico, dificultando la actividad del enzima y por lo tanto el enzima requiere más energía para realizar el mismo trabajo [98]. A medida que aumenta la temperatura la  $E_a$  va disminuyendo a consecuencia de un aumento en el hinchamiento de la matriz del polímero. Dicho hinchamiento produciría un descenso en el impedimento estérico, que llega a ser mínimo cuando se alcanzan temperaturas cercanas a la de máxima actividad del enzima. De esta forma se obtiene la mínima  $E_a$  (26kJ/mol) para las muestras con grado de reticulación,  $\chi = 1,6\%$ , valor cercano al del enzima libre (14,6kJ/mol) [99]



**Fig. 64** Representación de Arrhenius de las micropartículas con GOx y diferente grado de reticulación.

En este punto las pendientes de todas las micropartículas llegan casi a igualarse debido, no sólo al descenso del impedimento estérico del polímero como consecuencia de su hinchamiento, sino también a un incremento en la velocidad de difusión de los sustratos y productos. Ambos efectos aceleran la reacción enzimática hasta llegar al máximo [71, 98]. En el caso de la  $E_a$  de los biosensores con ácido acrílico, se mantiene constante a lo largo del todo el rango de temperaturas, como consecuencia del menor impedimento estérico generado por una red polimérica más hidratada.

Como se desprende de los resultados mostrados, las interacciones entre el polímero y el enzima pueden afectar de manera directa a la cinética del enzima. Algunos autores han postulado como una de las interacciones más comunes y responsables de las variaciones cinéticas, alteraciones superficiales de la carga del enzima, las cuales son las encargadas de guiar al sustrato hacia el centro catalítico [87].

### 3.1.5. Aplicación de los biosensores en sueros reales.

Se han empleado ambos tipos de biosensores en la determinación de glucosa en sueros reales. La tabla 6 muestra los resultados de las medidas comparados con los resultados obtenidos por el método de referencia, glucosa hexoquinasa.

**Tabla 6.** Resultado de las medidas de glucosa en sueros reales, de los biosensores comparadas con el método de referencia.

Muestra	Método referencia glucosa (mg/dL)	B. poli(acrilamida) glucosa (mg/dL)	Dsv %	B. 50 % ác acrílico glucosa (mg/dL)	Dsv %
1	74	80,21±1,21	8,4	75,90±2,6	2,6
2	75	82,42±1,13	9,9	74,06±1,18	-1,3
3	77	80,01±1,61	3,4	75,33±1,58	2,2
4	72	79,22±1,17	10,0	69,88±1,61	-2,9
5	76	79,78±0,52	5,0	74,25±0,11	-2,3

En la tabla anterior se observa como el biosensor de micropartículas de poli(acrilamida) mide por norma general más glucosa que el método de referencia de la glucosa hexoquinasa. Esto parece indicar que este biosensor detecta algún interferente existente en sangre. Por el contrario el biosensor con micropartículas de poli(acrilamida-ác. acrílico) mide concentraciones de glucosa muy similares a las obtenidas por el método de referencia, por lo que se deduce que este biosensor es el más selectivo. La tabla 7 muestra la recuperación de ambos biosensores.

**Tabla 7.** Resultados de recuperación de los biosensores propuestos.

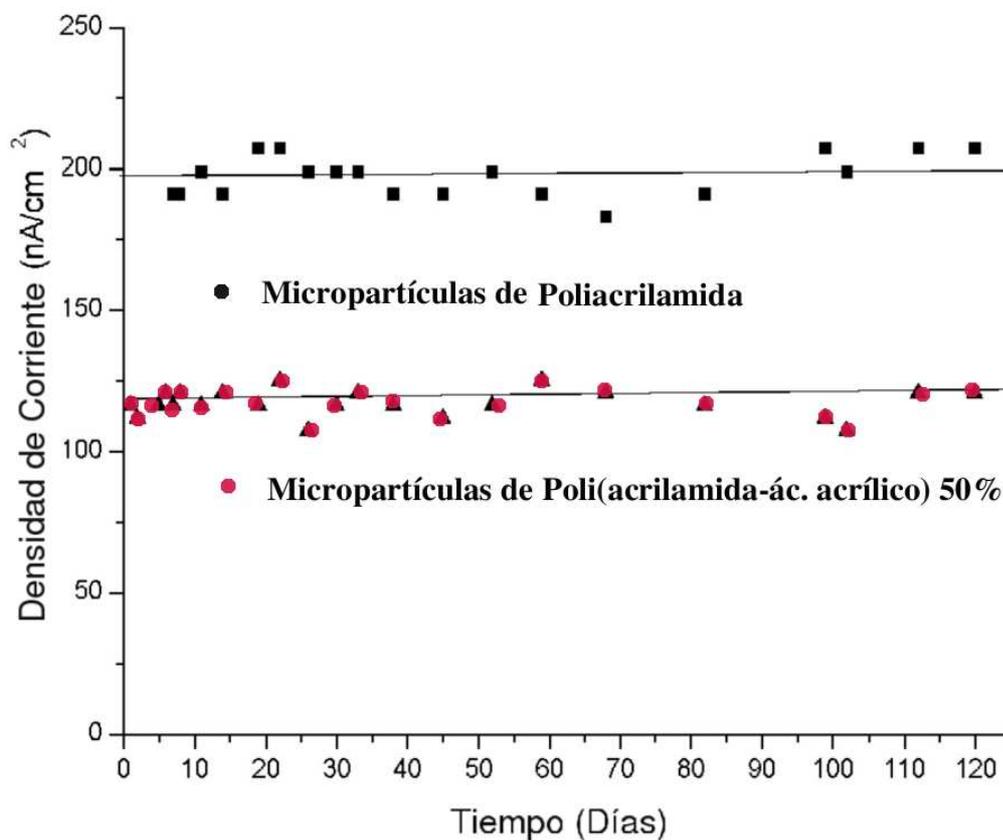
Muestra	glucosa añadida(mg/dL)	B. poli(acrilamida) glucosa (mg/dL)	R %	B. 50 % ác acrílico glucosa (mg/dL)	R %
1	72	71,82	99	67	94
2	72	75,72	105	68	95
3	72	74,50	103	73	102
4	72	74,50	103	72	100
5	72	70,6	98	74	103

En esta tabla se puede observar como la precisión de ambos es similar para la determinación de la glucosa, siendo capaces de determinar incrementos de glucosa añadidos a una muestra real con una precisión cercana al 100 %

### 3.1.6. Estabilidad de los biosensores

Se he evaluado la estabilidad de los biosensores realizando medidas de una concentración 0,5mM de glucosa a lo largo del tiempo. Estas medidas se realizaron a

pH 6 en un solución reguladora fosfato a 25°C polarizando el electrodo a +0,6V vs SCE, cuando los biosensores no fueron utilizados se mantuvieron a -4°C, figura 65.



**Fig. 65** Estabilidad de los biosensores preparados con las micropartículas de poli(acrilamida).

Como se ve, ambos biosensores fueron capaces de medir durante un período de tiempo superior a 150 días. Como consecuencia de la alta estabilidad mostrada por ambos sistemas poliméricos, su amplio rango de linealidad y sus cortos tiempos de respuesta, el sistema de inmovilización propuesto presenta interés para su aplicación en el campo de los biosensores.

## 3.2. Micropartículas de poli(acrilato magnésico) en el desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa biocompatibles.

Existe gran variedad de polímeros biocompatibles que pueden ser empleados para su aplicación in vivo. Un grupo importante son los formados por los acrilatos como el acrilato de magnesio, (AMgA). Este monómero ha sido sintetizado en nuestro laboratorio y polimerizado posteriormente para obtener un polímero biocompatible en el que se ha inmovilizado la GOx. El conjunto fue utilizado como componente biológico de un biosensor amperométrico biocompatible.

### 3.2.1. Preparación del monómero, acrilato de magnesio (AMgA)

La preparación del monómero de AMgA se realiza por medio de un proceso de neutralización de una disolución 2M de ácido acrílico con  $Mg(OH)_2$ . La reacción se realiza burbujeando  $N_2$  manteniendo la temperatura constante alrededor de  $20^\circ C$ . La reacción se da por finalizada alcanzado un pH 7,0. El resultado es una disolución transparente con una riqueza de AMgA cercana al 20 %.

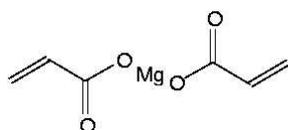
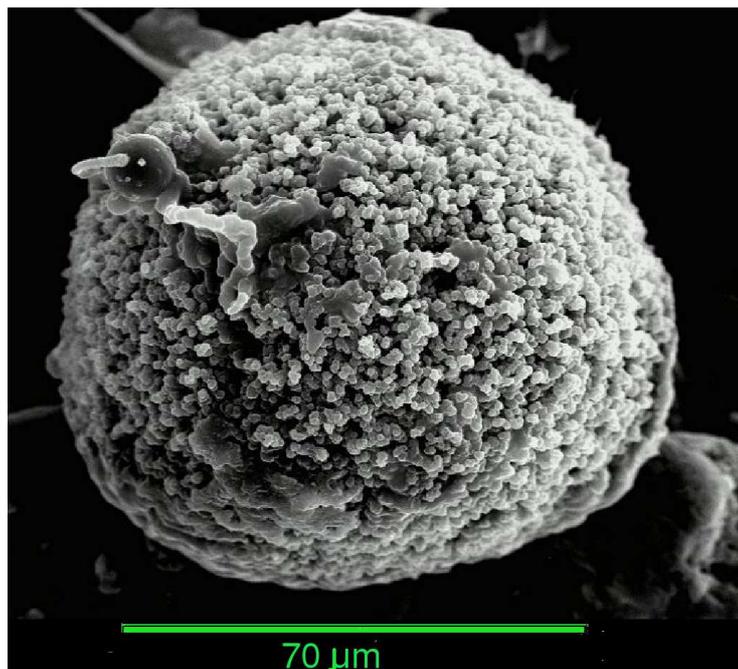


Fig. 66 Estructura del monómero de AMgA.

La figura 66 muestra la estructura química de la molécula de AMgA, formada por dos grupo acrílicos unidos entre si mediante un átomo de magnesio.

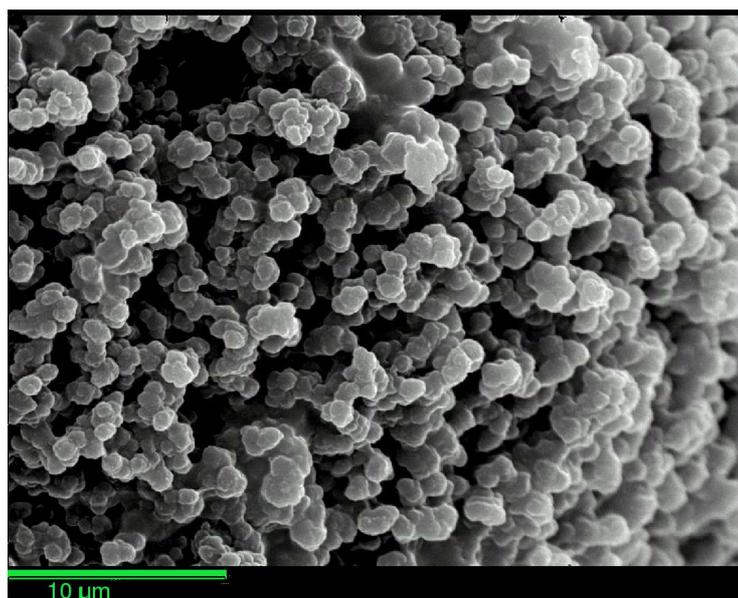
### 3.2.2. Síntesis de micropartículas de poli(AMgA)

La preparación de las micropartículas de poli(AMgA) fue realizada de manera similar a la de las micropartículas de poli(acrilamida), con la única variación de utilizar en la fase acuosa de la emulsión una solución constituida por 5ml a pH 7,0 de AMgA al 20 % anteriormente preparada. Sobre ésta se disolverán el resto de los constituyentes, es decir, la BIS (3%p/p) el PAS y la GOx. Una vez preparada la emulsión, el monómero es polimerizado tras la adición del TEMED. Como consecuencia se genera un polímero en la fase interna de la emulsión concentrada, con forma y tamaño similar a la de la gotícula precursora. La figura 67 muestra el resultado de dicha polimerización. Como se puede observar la microscopia electrónica de barrido muestra una micropartícula rugosa, que podría estar constituida a su vez por nanopartículas de polímero.



**Fig. 67** Micrografía electrónica de las micropartículas de AMgA sintetizadas.

La figura 68 muestra la estructura de la superficie de la partícula de forma más detallada. Esta figura parece indicar que la partícula sintetizada está constituida por micropartículas de poli(AMgA) de un tamaño aproximado de  $1\mu$ . Este fenómeno, podría deberse a la baja concentración de monómero de AMgA dentro de la gotícula de la emulsión  $\sim 1,1M$ , especialmente si lo comparamos con los  $\sim 3,4M$  de acrilamida que hay en las micropartículas de poli(acrilamida). La baja concentración de monómero podría dar lugar a una polimerización similar a la llevada a cabo en soluciones diluidas de monómero que se utilizan como precursoras de nanopartículas [68].



**Fig. 68** Micrografía electrónica de las micropartículas de AMgA sintetizadas.

### 3.2.3. Análisis estructural de las micropartículas de poli(AMgA).

Antes de realizar la encapsulación del enzima en el interior de las micropartículas, se han investigado las características estructurales del polímero.

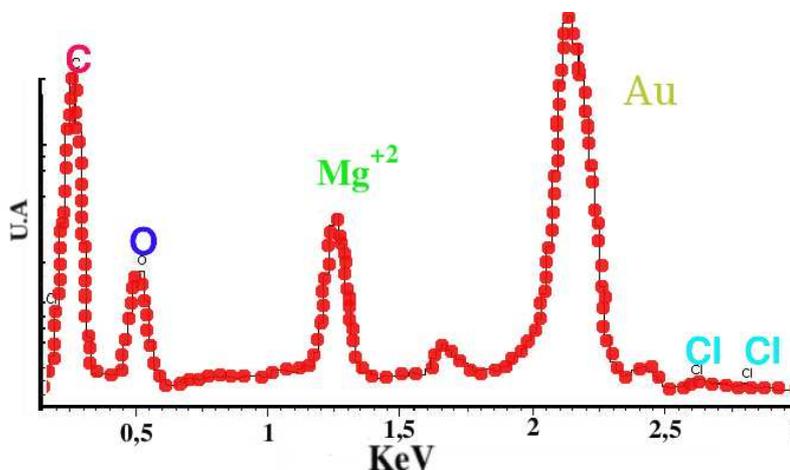
#### Análisis elemental de elementos.

El análisis elemental de elementos es una herramienta que nos permite determinar de manera semicuantitativa la composición atómica de las muestras objeto de estudio. En este caso se ha estudiado la cantidad de  $Mg^{+2}$  que permanece en la estructura del polímero después de haber sido dializado con agua destilada durante varios días. En la tabla 8 se muestran los resultados de riqueza relativa de cada componente presente en el polímero.

**Tabla 8.** Riqueza relativa de cada componente presente en el polímero.

Elemento	Intensidad	Peso (%)	Riqueza (%)
Carbono	0,87	57,30	65,71
Oxígeno	0,44	34,58	29,77
Magnesio	0,74	7,69	4,36
Cloro	0,80	0,43	0,17
Total		100	100

La figura 69 muestra el registro de riqueza relativa obtenida del análisis de los microgeles.

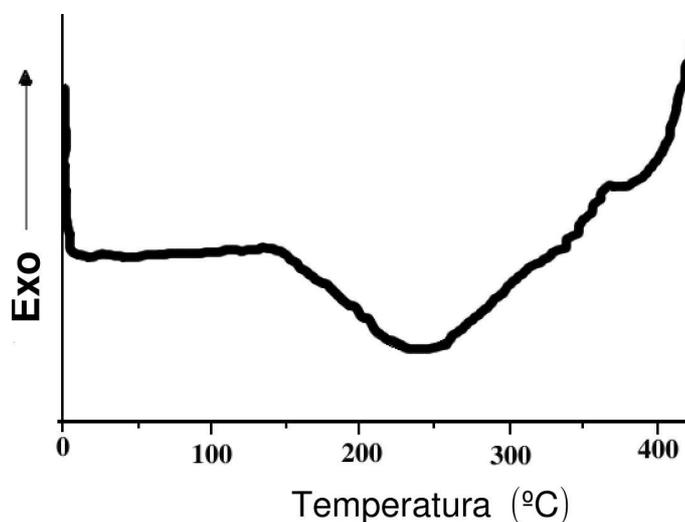


**Fig. 69** Registro de riqueza relativa de los componentes constituyentes del microgel.

Como se puede apreciar en la tabla 8, el análisis de la muestra, revela la presencia de 15 átomos de carbono por cada átomo de  $Mg^{+2}$ , es decir, 5 monómeros de ác. acrílico por átomo de  $Mg^{+2}$ . También se detecta una pequeña proporción de cloro procedente de impurezas propias de las sales utilizadas en la síntesis.

## Caracterización mediante DSC

Las micropartículas han sido sometidas a análisis mediante calorimetría diferencial de barrido. El registro se muestra en la figura 70.

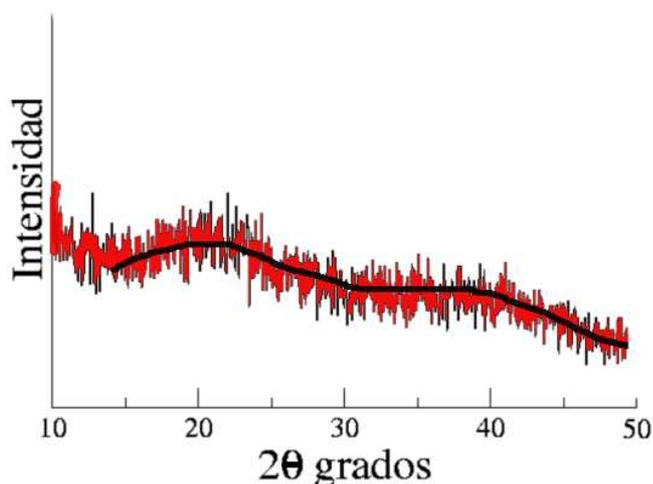


**Fig. 70** Registro calorimétrico de micropartículas de poli(AMgA).

Como se puede observar en la figura anterior, existe un pico endotérmico consecuencia probable de la descomposición del polímero a 250°C, y la consiguiente liberación de  $CO_2$ . En el termograma de este polímero no se observa ninguna  $T_g$  en el rango de temperaturas estudiado.

## Caracterización mediante difracción de rayos X

Se ha estudiado, mediante difracción de rayos X, la estructura de las micropartículas de poli(AMgA) y en la figura 71 se muestra el registro de difracción de las mismas.



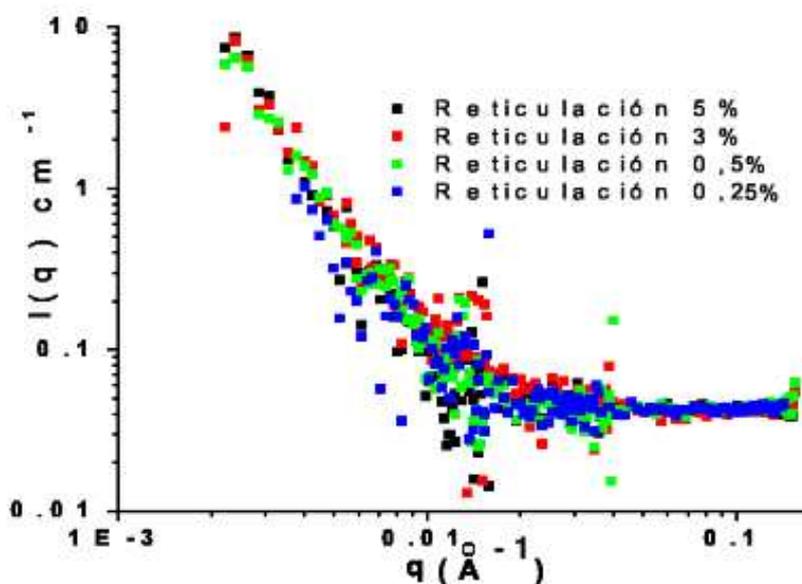
**Fig. 71** Diagrama de difracción de rayos X de las micropartículas de poli(AMgA).

Tal y como se puede observar los registros de difracción de las micropartículas de poli(AMgA), estas presentan una estructura amorfa con dos halos; uno centrado a  $2\theta=20^\circ$  y el otro a  $2\theta=40^\circ$ , que se corresponden con espaciados de  $4,6\text{\AA}$  y  $2,3\text{\AA}$  respectivamente. Los dos picos aparecen a  $d$  y  $d/2$ , lo que podría indicar algún tipo de orden en la estructura polimérica tipo cristal líquido.

### Caracterización mediante dispersión de neutrones

Con el fin de obtener mayor información estructural, se han realizado estudios con dispersión de neutrones en muestras de micropartículas de poli(AMgA). Los estudios se han llevado a cabo variando parámetros de la síntesis como el grado de reticulación y la presencia o no de enzima. Además, y teniendo en cuenta que el polímero presenta grupos ionizables, se ha estudiado su estructura a diferentes pH, tanto por encima como por debajo del pKa del residuo de carboxilo.

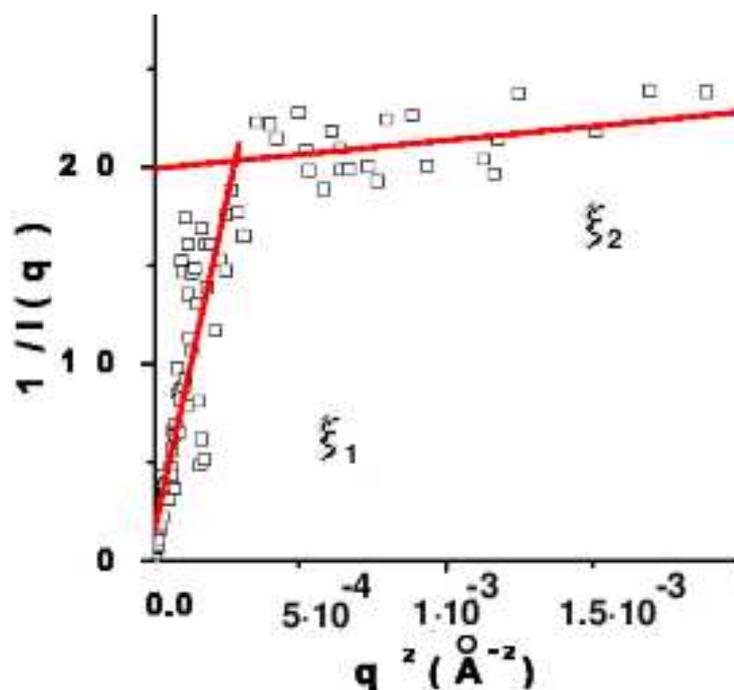
**Influencia del grado de reticulación.** Para realizar este estudio se prepararon cuatro tipos de micropartículas de poli (AMgA) en las que el grado de reticulación fue 0,25 %, 0,5 %, 3 % y 5 %. Posteriormente las muestras fueron dispersadas en agua pesada hasta alcanzar el equilibrio. La figura 72 muestra los diagramas de dispersión de las 4 muestras de micropartículas analizadas.



**Fig. 72** Diagramas de dispersión de neutrones de muestras de AMga con diferentes grados de reticulación.

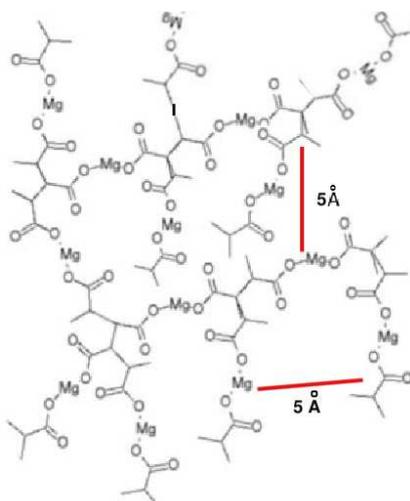
Como se puede observar el grado de reticulación apenas produce variaciones en el diagrama de dispersión de neutrones del polímero.

La figura 73 muestra el diagrama de Ornstein-Zernike del espectro de difracción de las micropartículas con grado de reticulación 3% sin enzima.



**Fig. 73** Representación de Ornstein-Zernike del espectro de dispersión de las micropartículas con grado de reticulación 3% sin enzima.

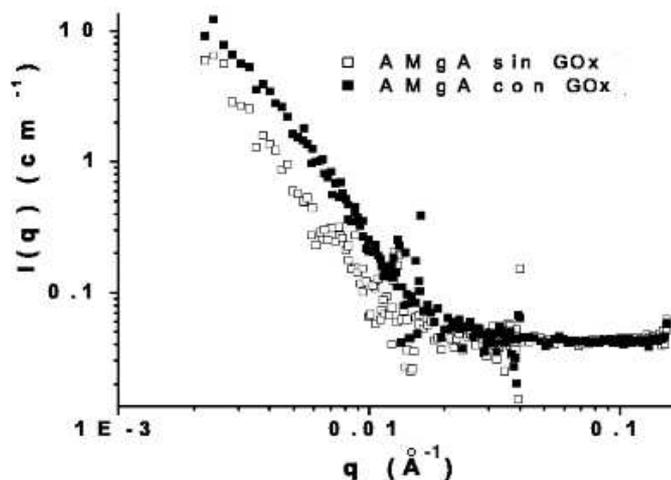
De la figura anterior se obtienen dos distancias de correlación de la red;  $\xi_1 = 250\text{\AA}$  y  $\xi_2 = 4,8\text{\AA}$ . La constancia de las distancias de red poliméricas en función del grado de reticulación podría indicar que el principal responsable de la estructura del polímero es el  $Mg^{+2}$  y no el agente reticulante empleado en la polimerización. Los puentes iónicos formados los  $Mg^{+2}$  entre los grupos carboxílicos estabilizarían las red polimérica. En la figura 74 se muestra el modelo que proponemos para la estructura del poli(AMgA).



**Fig. 74** Posible estructura de la red de poli(AMgA) con los puentes de  $Mg^{+2}$  entrelazando los grupos carboxílicos.

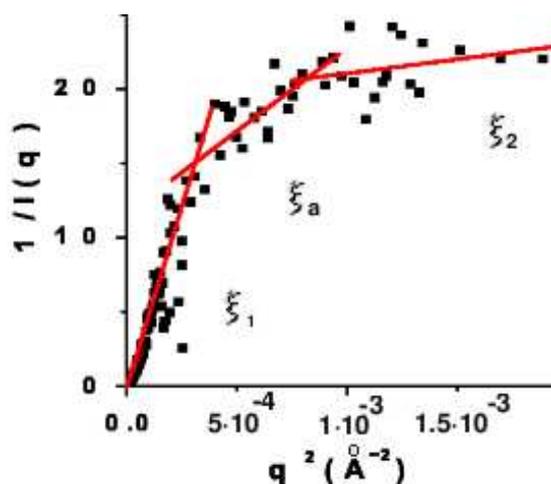
En esta figura se puede observar como la distancia entre cadenas podría ser alrededor de  $5\text{\AA}$ , distancia similar a la medida por difracción de neutrones y rayos X.

**Modificaciones estructurales como consecuencia de la inmovilización del enzima.** Como ya hemos visto en el capítulo anterior, el atrapamiento del enzima en el seno de una red polimérica produce modificaciones en la acomodación de la cadenas del polímero. La figura 75 muestra el registro de doble logaritmo de dos muestras de micropartículas de poli(AMgA), con idéntico grado de reticulación  $\chi=3\%$ , una con GOx en su interior y la otra sin GOx.



**Fig. 75** Diagrama de dispersión de neutrones de micropartículas de poli(AMgA) una con y sin GOx en su interior.

Como se puede apreciar en la figura, al introducir la GOx en el interior de las micropartículas, se observa un desplazamiento de la intensidad para valores de  $q < 1/\xi$  manteniendo sin embargo en ambos casos una dependencia del tipo  $I(q) \sim q^{-2}$ .



**Fig. 76** Diagrama de Ornstein-Zernike de las micropartículas de poli(AMgA) con grado de reticulación 3% con GOx en el interior.

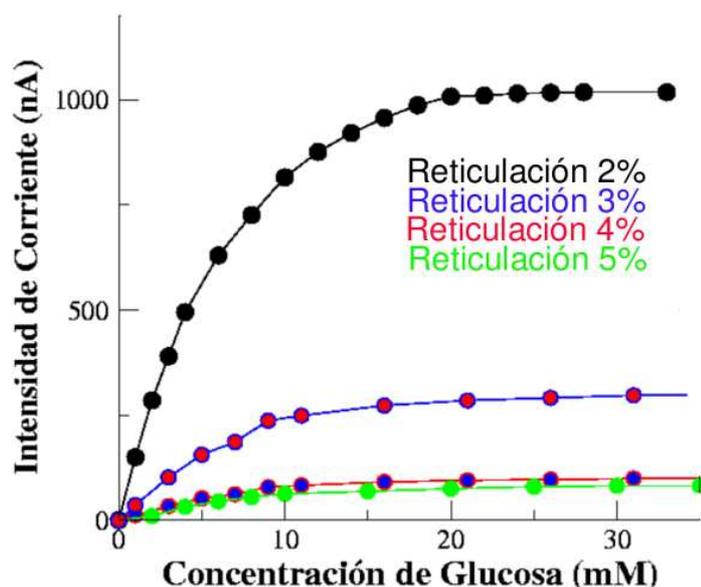
La figura 76 representa el diagrama de Ornstein-Zernike de las micropartículas con igual grado de reticulación pero con el enzima inmovilizada en el interior. En esta figura se puede ver como al inmovilizar el enzima en el interior, aparece una nueva distancia de correlación intermedia  $\xi_a = 25 \text{ \AA}$  que no aparecía en el caso de las micropartículas sin enzima. De forma similar al caso de las micropartículas de poli(acrilamida), la GOx produce alteraciones en la acomodación de las cadenas del polímero generando una nueva distancia de correlación.

### 3.2.4. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli(AMgA)

En las micropartículas de poli(AMgA) se ha inmovilizado GOx. Las partículas resultantes han sido empleadas como componente biológico de un biosensor amperométrico biocompatible de glucosa, capaz de realizar medidas "in vivo".

### 3.2.5. Influencia del grado de reticulación en la respuesta del biosensor compatible

El estudio se ha realizado en micropartículas con grados de reticulación 5 %; 4 %; 3 % y 2 %. Las medidas amperométricas para obtener las curvas de calibración fueron llevadas a cabo en una solución reguladora fosfato-acetato 0,1 M, a pH 6. En todos los casos se mantuvo el electrodo a un sobrepotencial de +0,6V vs Ag/AgCl.



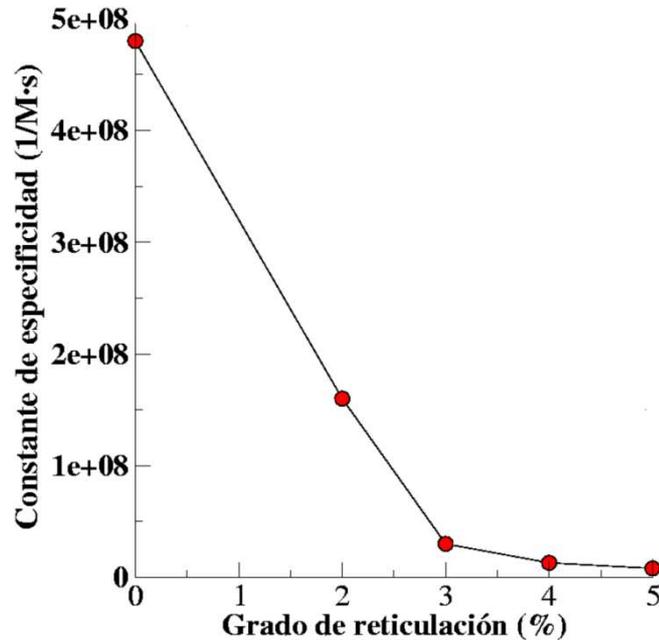
**Fig. 77** Curvas de calibración de los biosensores preparados con micropartículas de poli(AMgA) con diferentes grados de reticulación.

La tabla 9 muestra el índice de Hill obtenido de cada una de las curvas de calibración anteriores.

**Tabla 9.** Índice de Hill obtenido de las curvas de calibración

Grado de reticulación	índice de Hill
5 %	1,7
4 %	1,49
3 %	1,5
2 %	1,3

Los resultados muestran como el índice de Hill se desvia de la unidad a medida que aumenta el grado de reticulación. Ésto implicaría una desviación en el comportamiento de Michaelis-Menten del enzima debido, posiblemente a problemas difusionales del sustrato al atravesar la red polimérica. Este resultado hace pensar que la cinética de reacción es muy lenta por estar limitada difusionalmente. Esta idea ha sido corroborada calculando la  $K_{esp}$  del enzima inmovilizada en estas micropartículas que se muestra en la figura 78.



**Fig. 78** Constante de especificidad de la GOx inmovilizada en el interior de las micropartículas de AMgA.

Por ser biocompatible este polímero es muy interesante para desarrollar biosensores de aplicación in vivo. Sin embargo los problemas difusionales nos han llevado a buscar otros polímeros biocompatibles que tengan cinéticas difusivas más rápidas y que permitan obtener biosensores con tiempos de respuesta más cortos.

### 3.3. Micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) en el desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa biocompatibles.

La poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) es uno de los polímero biocompatibles más utilizados dentro de la industria farmacéutica [100]. Este polímero ha sido utilizado durante los últimos años como un sistema de liberación controlada de fármacos, debido, entre otras cualidades, a su gran porosidad, tal y como se muestra en la gran multitud de artículos existentes al respecto [101, 102, 103]. Por otro lado, la facilidad de su síntesis así como su manipulación, permite que se puedan preparar sistemas coloidales como micropartículas en los que poder inmovilizar enzimas con relativa facilidad [104, 105, 106] .

#### 3.3.1. Síntesis de poli( $\epsilon$ -caprolactona)

En este trabajo se han preparado micropartículas de PCL mediante el método de evaporación del disolvente de la fase interna de una emulsión, en el que previamente había sido disuelto el polímero. Por este motivo se han sintetizado cadenas lineales de PCL de peso molecular 35.000 daltons, mediante el método de apertura de anillo, tal y como se muestra en la figura 79.

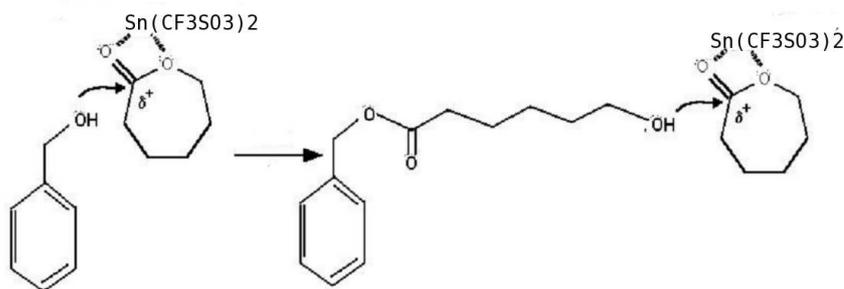


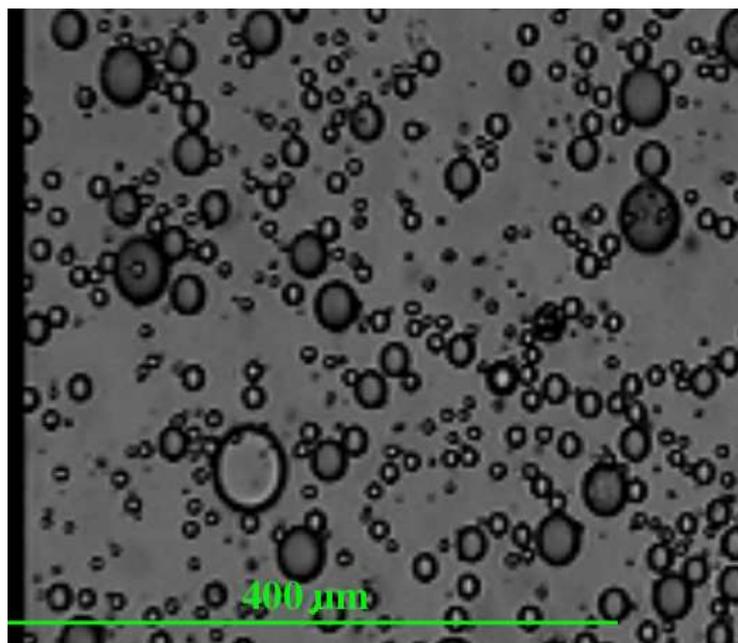
Fig. 79 Síntesis de la cadena lineal de PCL

Tal y como se puede ver en la figura anterior, las cadenas lineales son sintetizadas por medio de una reacción de apertura de anillo del monómero. En esta reacción el monómero sufre un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del anillo por parte de un grupo hidroxilo, procedente del alcohol bencílico. Este ataque está favorecido por mediación de un ácido de Lewis, el trifluoro metil sulfonato de  $Sn^{+2}$ . Este ácido de Lewis acepta parte de la carga electrónica de los oxígenos de la  $\epsilon$ -caprolactona (CL) incrementando de esta forma la  $\delta^+$  del carbonilo. Esto favorece el ataque del grupo OH al carbonilo. Como resultado de esta reacción se forma un enlace éster entre el oxígeno del hidroxilo del alcohol bencílico y el carbono carbonilo. Además como resultado se produce la ruptura del anillo de la  $\epsilon$ -CL generando una cadena en la que existe un hidroxilo terminal que puede continuar el ataque sobre otro monómero de  $\epsilon$ -CL. Finalmente se obtienen cadenas lineales de PCL. Para realizar la síntesis de las cadenas se ha utilizado un matraz aforado de tres bocas, en el que se

ha añadido una disolución formada por 15mL de  $\epsilon$ -CL, 157 mg de alcohol bencílico y 80mg de trifluoro metanosulfonato de  $Sn^{+2}$ . A esta disolución se le hace pasar  $N_2$  con el fin de mantener una atmósfera inerte durante toda la síntesis. Disueltos los componentes, se calienta la solución hasta  $75^\circ C$  durante 12 horas. Cuando se alcanza esta temperatura comienza el proceso de polimerización tras el cual se obtiene un líquido, que tras enfriarse lentamente, solidifica formando un polímero blanco.

### 3.3.2. Síntesis de las micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona).

Para poder obtener micropartículas de PCL con GOx en su interior se ha recurrido a un método basado en la precipitación de las cadenas del polímero en el interior de las gotículas de una emulsión de fase interna oleosa. Para esto se disuelve una cantidad pesada de polímero en  $CH_2Cl_2$  y sobre esta disolución se dispersa la GOx. Todo esto constituirá la fase interna de la emulsión precursora. Esta fase oleosa es dispersada por un polítron a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos, en 10ml de una solución al 10 % (p/p) de alcohol polivinílico de peso molecular 70.000 daltons. El alcohol polivinílico actúa como estabilizador de la emulsión o/w. La figura 80 muestra la emulsión o/w precursora de las micropartículas de policaprolactona.



**Fig. 80** Micrografía de la emulsión precursora de las micropartículas de PCL.

Preparada la emulsión, el  $CH_2Cl_2$  comienza a evaporarse lentamente a temperatura ambiente. Este proceso lleva consigo la precipitación de las cadenas PCL en el interior de las micropartículas atrapando la enzima que había sido dispersada en su interior.

La tabla 10 muestra la composición de cada una de las fases constituyentes de la emulsión precursora de las micropartículas.

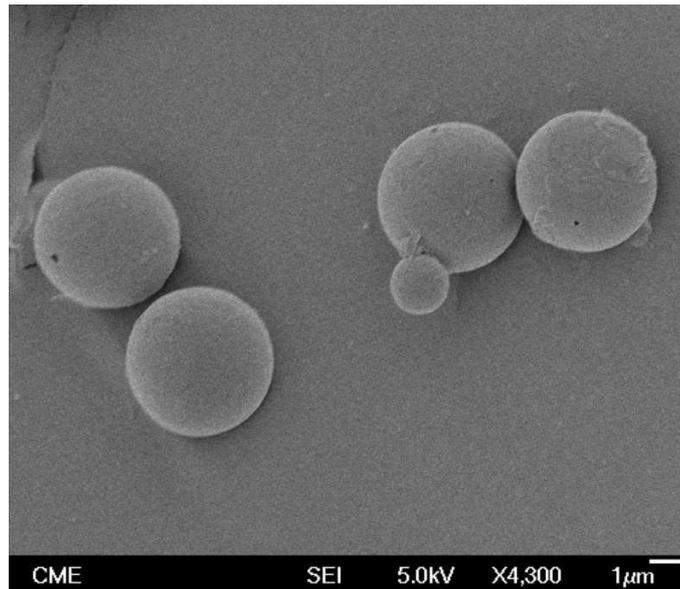
**Tabla 10** Composición de la emulsión precursora de las micropartículas de PCL.

Fase interna		
$CH_2Cl_2$	2,5 mL	
PCL	~500 mg	20 %
GOx	250mg	10 %
Fase externa		
$H_2O$	15 mL	
Alcohol polivinílico	1,5 g	10 %

El resultado de la síntesis anterior se muestra en la micrografía SEM de la figura 81. Durante este trabajo se han preparado diferentes tipos de micropartículas en las que se ha variado el porcentaje de polímero disuelto en la fase interna de la emulsión. Este porcentaje viene definido como:

$$P_{\epsilon}(\%) = \frac{P_g}{P_g + L_g} \times 100 \quad (3.23)$$

Donde  $P_{\epsilon}(\%)$  es el porcentaje de polímero disuelto,  $P_g$  es la cantidad de polímero disuelto en gramos y  $L_g$  es la cantidad de fase oleosa empleada en gramos.



**Fig. 81** Micrografía de barrido SEM de las micropartículas de policaprolactona sintetizadas.

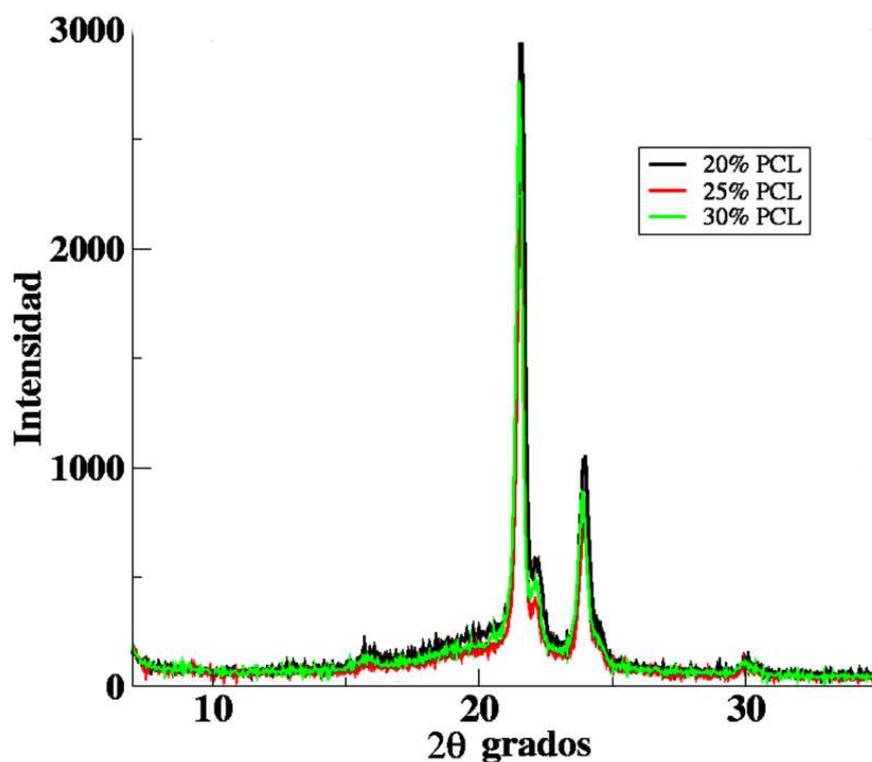
En la figura 81 se observan micropartículas de policaprolactona obtenidas por el proceso anterior. Cabe destacar que las micropartículas tienen unos tamaños comprendidos entre  $[1\mu\text{m}- 5\mu\text{m}]$  y forma esférica resultado de la precipitación del polímero en el interior de la fase oleosa de la emulsión durante su síntesis.

### 3.3.3. Análisis estructural de las micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona)

. En este tipo de micropartículas el atrapamiento de sustancias en su interior está relacionado como en los casos anteriores con el tamaño del poro de la red de polímero. En estos sistemas, es posible controlar el tamaño del poro variando la cantidad de cadenas que forman parte de las micropartículas, de tal forma que a mayor densidad de cadenas, menor tamaño del poro. Por este motivo se ha estudiado la estructura de las micropartículas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona), mediante difracción de rayos X y DSC intentando relacionar las variaciones en la densidad de polímero con las alteraciones estructurales en las micropartículas.

#### Caracterización mediante difracción de rayos X

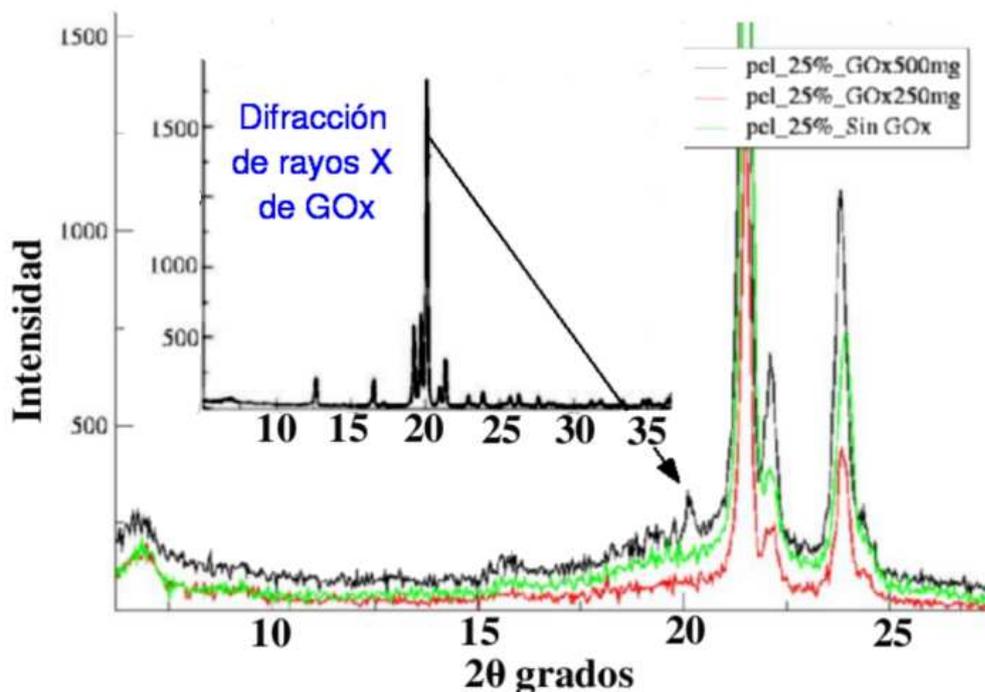
Se ha estudiado la estructura de las micropartículas sintetizadas mediante difracción de rayos X en los intervalos comprendidos entre  $2\theta=5^\circ$  y  $2\theta=50^\circ$ . Los registros de las micropartículas de PCL sin GOx en su interior son mostrados en la siguiente figura.



**Fig. 82** Difracción de rayos X de las micropartículas sin GOx, preparadas a partir de diferentes concentraciones de polímero.

El polímero muestra una estructura semicristalina en la que se pueden observar 6 máximos de difracción a  $2\theta=6,9$ ;  $2\theta=15,9$ ;  $2\theta=21,51$ ;  $2\theta=22,1$ ;  $2\theta=23,9$  y  $2\theta=30,0$ ; estas distancias se corresponden según la ley de Bragg a  $13,48\text{\AA}$ ;  $5,76\text{\AA}$ ;  $4,29\text{\AA}$ ;

4,19;Å; 3,86Å y 3,09Å respectivamente y hacen referencia a un sistema cristalino ortorrómbico típico de este tipo de polímeros [107, 108, 109]. Al incluir el enzima dentro de la estructura del polímero no se observa ninguna variación en la posición de los picos, tal y como se puede ver en la figura 83.

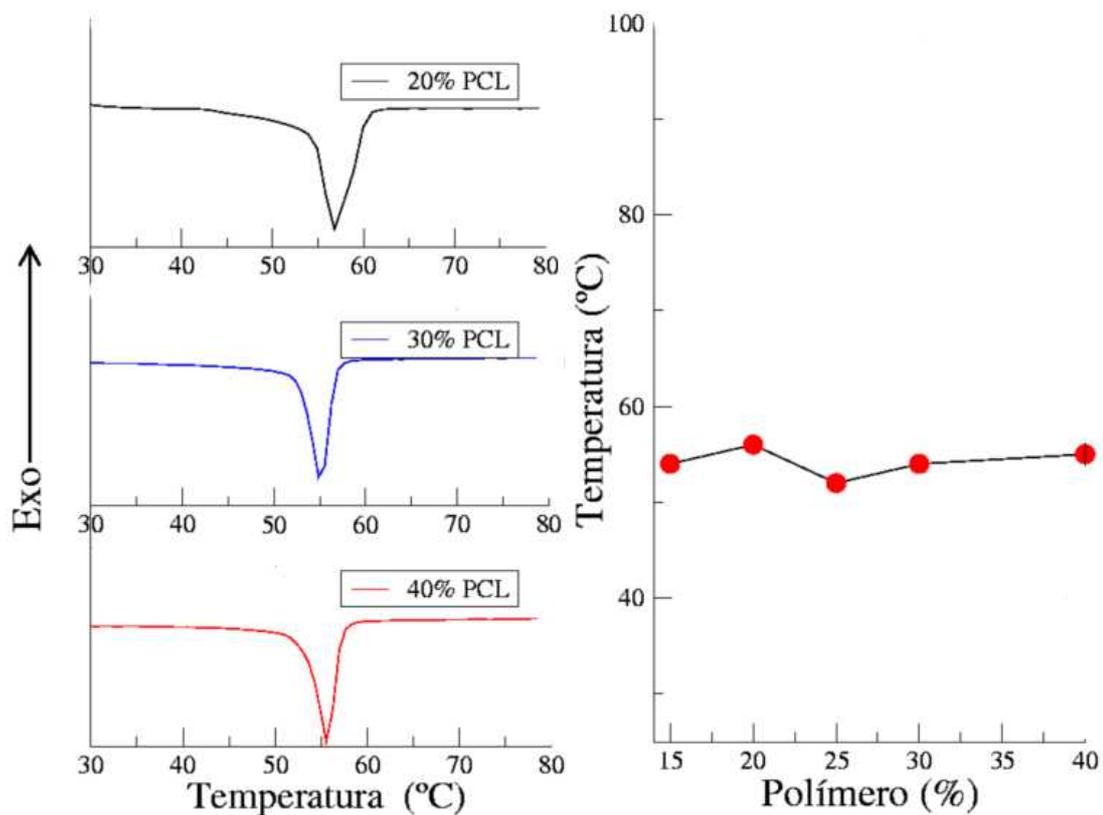


**Fig. 83** Difracción de rayos X de las micropartículas sin GOx, preparadas a partir de diferentes concentraciones de polímero.

Sin embargo, el atrapamiento del enzima en el interior de las micropartículas, hace que aparezca un pico cristalino a  $2\theta=21^\circ$ , cuando la concentración de enzima utilizada en la síntesis de las micropartículas es de 500mg de GOx. Este pico se corresponde con el pico de mayor intensidad en el diagrama de difracción del enzima, como se puede ver en el plot insertado en la figura 83. Este resultado indica que cuando se inmovilizan 2500 unidades de enzima ésta se encuentra en forma cristalina. Esto es lógico teniendo en cuenta que la inmovilización se lleva a cabo en un medio oleoso, donde están disueltas las cadenas del polímero, y en el que la enzima está dispersada en forma de cristales de pequeño tamaño, que son los que forman parte de las gotículas de la fase interna de esta emulsión.

### Caracterización mediante DSC.

Se han estudiado las micropartículas de PCL utilizando calorimetría diferencial de barrido. En la figura 84 se puede observar la existencia de un pico de fusión del polímero alrededor de  $55^\circ\text{C}$  [68, 107, 110]. Al analizar las micropartículas sintetizadas a partir de diferentes concentraciones de PCL se puede observar como apenas hay variaciones en la temperatura de fusión, que está comprendida entre  $56$  y  $52^\circ\text{C}$ , sin mantener una tendencia clara.



**Fig. 84** Difracción de rayos X de las micropartículas sin GOx, preparadas a partir de diferentes concentraciones de polímero.

Al estudiar la temperatura de fusión en las micropartículas con enzima inmovilizada, se obtuvieron temperaturas de fusión similares. Lo que indica que la inmovilización del enzima apenas altera la estructura semicristalina del polímero.

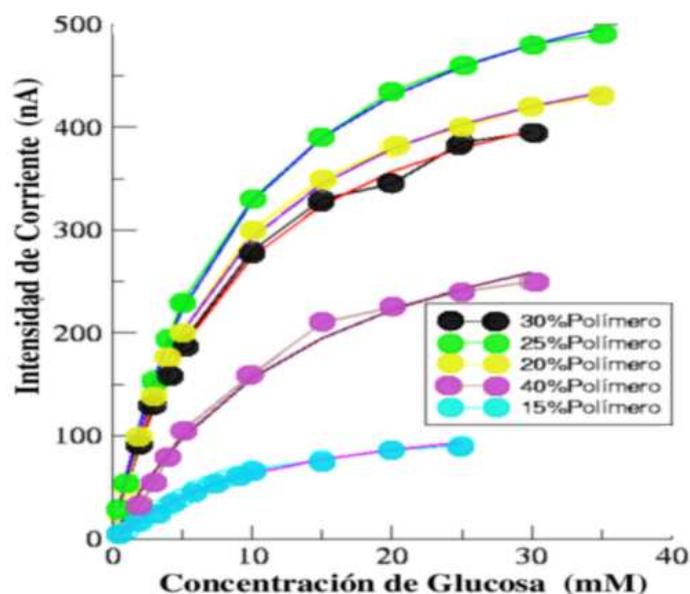
### 3.3.4. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona)

Utilizando las micropartículas de PCL, en las que se había inmovilizado GOx en su interior, se han preparado diferentes tipos de biosensores amperométricos, que tienen como principal característica el ser biocompatibles y poder ser aplicados a medidas *in vivo*. Al igual que en los capítulos anteriores, los biosensores estaban formados por un electrodo de platino en el cual eran fijadas las micropartículas mediante una membrana de diálisis.

### 3.3.5. Factores que influyen en la respuesta amperométrica del biosensor biocompatible de glucosa.

Con el fin de optimizar y mejorar la señal del biosensor se han estudiado parámetros tales como porcentaje de polímero empleado en la síntesis, carga enzimática de las micropartículas empleadas así como cantidad de micropartículas.

#### Influencia de la cantidad de cadenas de polímero



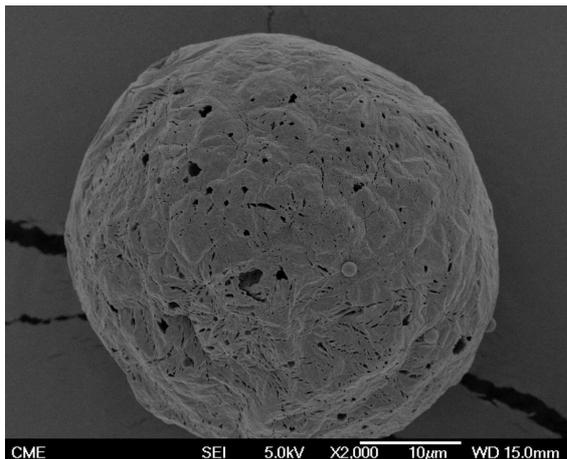
**Fig. 85** Curvas de calibración de biosensores preparados con diferentes cantidades de PCL.

La figura 85 muestra las curvas de calibración de diferentes biosensores preparados con micropartículas de PCL en los que se utilizaron diferentes porcentajes de polímero. Tal y como se puede observar, la respuesta del biosensor se ve alterada por el porcentaje de polímero empleado durante la síntesis de las micropartículas. La tabla 11 muestra los índices de Hill obtenidos de las curvas de calibración de los biosensores preparados con las micropartículas con diferentes porcentajes de PCL.

**Tabla 11.** Índice de Hill obtenido de las curvas de calibración.

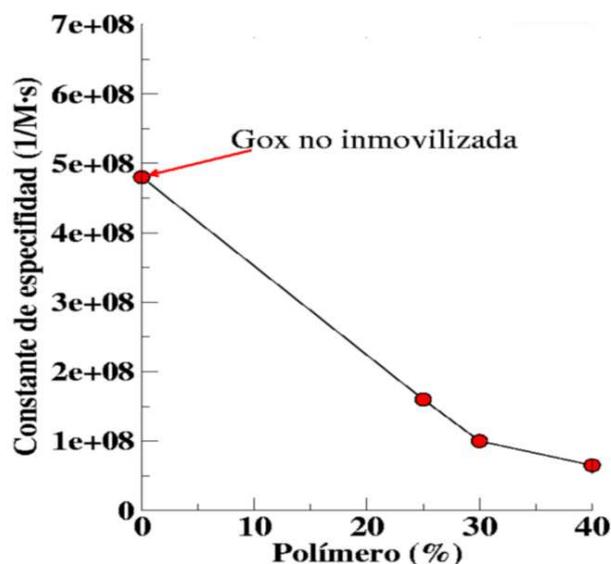
Porcentaje de polímero	índice de Hill
15 %	1,03
20 %	1,10
25 %	1,09
30 %	1,07
40 %	0,99

Los índices de Hill obtenidos de las micropartículas de PCL son similares a 1, lo que indica que la cinética de la enzima inmovilizada se ajusta a Michaelis-Menten.



**Fig.86** Microscopia electrónica SEM donde se pueden observar los poros de las micropartículas con 15 % de polímero.

Como se observa en la figura 86, al disminuir el porcentaje de polímero en las micropartículas decrece la  $V_{max}^{ap}$  debido a la salida del enzima de la red de polímero, consecuencia de la alta porosidad de estas micropartículas, figura 86.

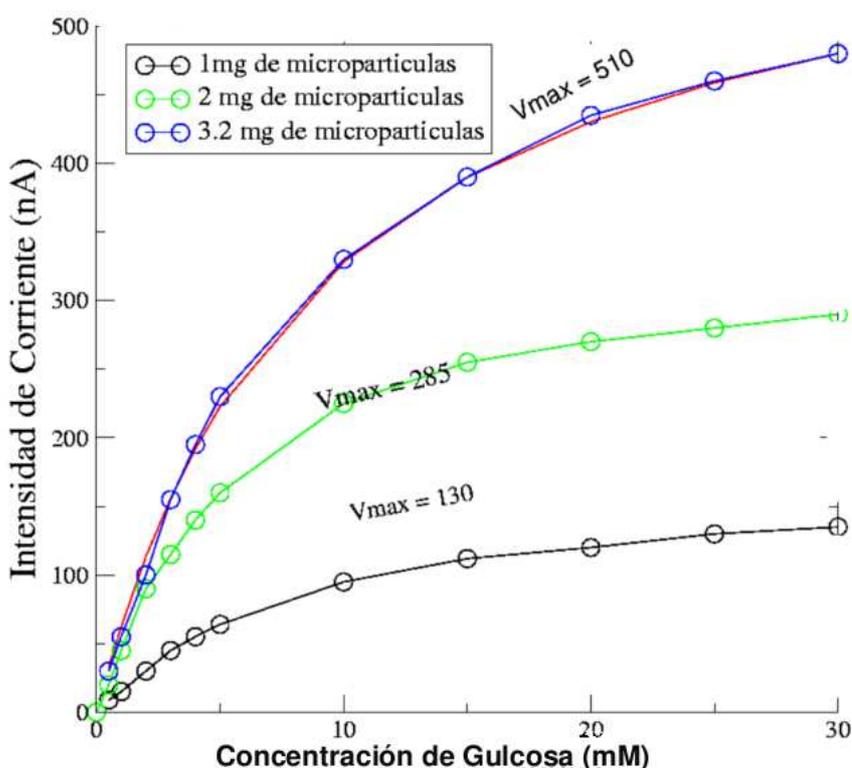


**Fig. 87** Representación de la  $K_{esp}$  en función del porcentaje de polímero en las micropartículas.

Por el contrario, el aumento en el porcentaje de polímero da lugar a poros más pequeños, lo que hace que más enzima quede inmovilizada, aumentando la  $V_{max}^{ap}$  hasta que la concentración de polímero llega al 25%. A partir de este valor, porcentajes superiores de polímero producen una disminución del tamaño del poro. Esto estaría unido a un descenso en la cinética difusiva del sustrato hacia el centro catalítico que provoca un descenso en la  $K_{esp}$ , figura 87. Debido a estos resultados se ha elegido el porcentaje de polímero del 25% como el óptimo para inmovilizar la GOx en su interior.

### Influencia de la cantidad de micropartículas utilizadas

Se ha estudiado la influencia de la cantidad de micropartículas depositadas sobre el electrodo en la repuesta del mismo y el resultado se muestra en la figura 88.

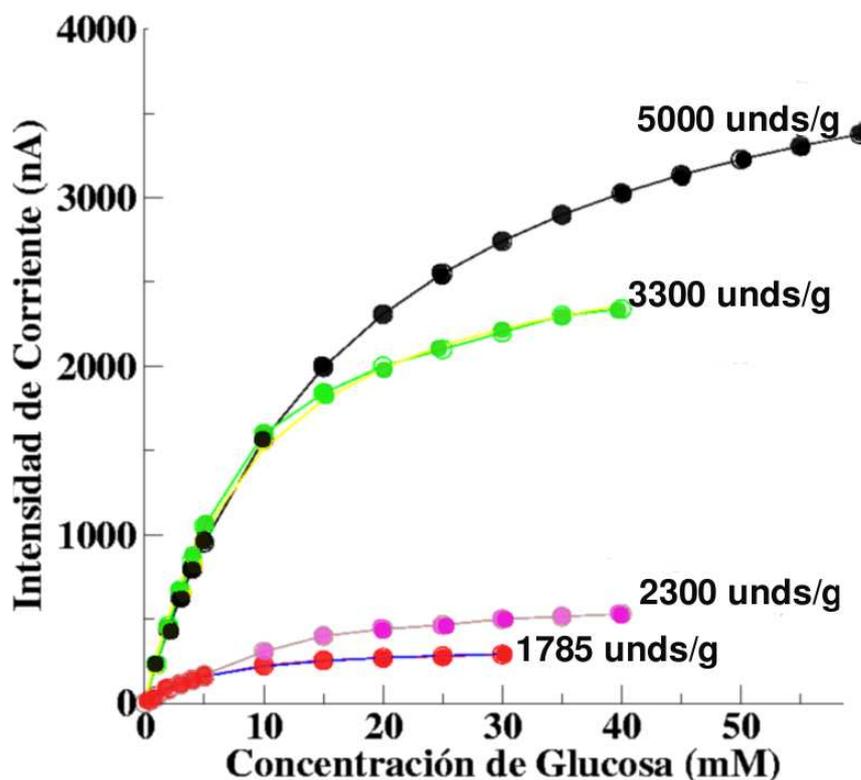


**Fig. 88** Curvas de calibrado del biosensor preparado con diferentes cantidades de micropartículas con un porcentaje de polímero del 25%.

Como se puede observar, a medida que aumentamos la cantidad de micropartículas en la superficie del electrodo, aumenta la  $V_{max}^{ap}$ , debido a la presencia de mayor número de centros activos. Como consecuencia hemos elegido la cantidad máxima de micropartículas 3mg, que es además el máximo que puede ser inmovilizada en el electrodo.

### Influencia de la cantidad de enzima inmovilizada en las micropartículas.

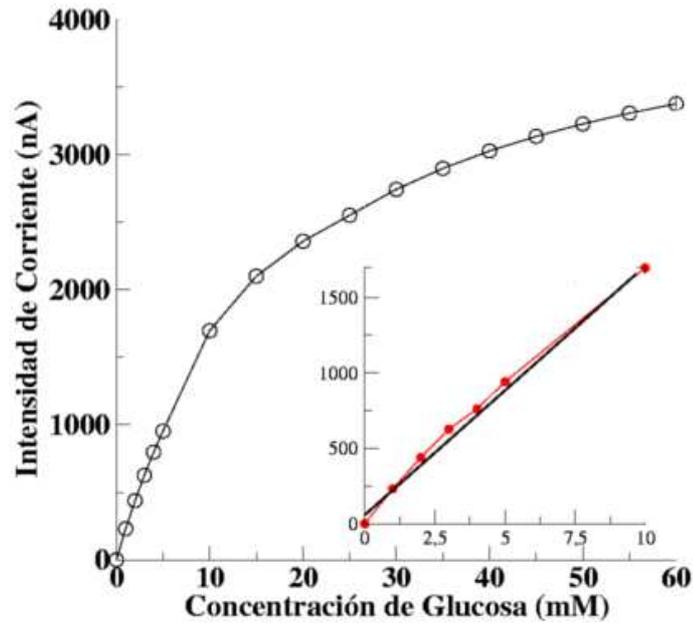
Se ha estudiado la influencia de la cantidad de GOx inmovilizada en el comportamiento de los biosensores amperométricos. Para ello se han preparado micropartículas en cuya fase interna oleosa se han dispersado diferentes cantidades de GOx. Las cantidades de GOx elegidas han sido: 1785UI/g, 2333UI/g, 3333UI/g y 5000UI/g. Con esto se persigue mejorar las propiedades analíticas de los biosensores preparados, incrementando el límite de linealidad del dispositivo resultante. La figura 89 muestra las curvas de calibración de biosensores preparados con cantidades diferentes de GOx.



**Fig. 89** Curvas de calibración de biosensores preparados con diferentes cantidades de GOx.

Como se puede observar, al aumentar la concentración de GOx, aumenta la  $V_{max}$  desde 350nA hasta 2600nA. Las micropartículas preparadas con 3300 UI/g y 5000 UI/g presentan actividades enzimáticas similares, lo que parece indicar que a partir 3300UI/g la capacidad de encapsulación llega a saturación. Al comparar con la inmovilización en la micropartículas de poli(acrilamida), se obtiene que la inmovilización en PCL es menos efectiva, necesiéndose más UI/g de enzima para obtener una intensidad de corriente similar.

La figura 90 muestra la curva de calibración del electrodo preparado con micropartículas con 5000 UI/g de GOx. Este biosensor tiene un rango de linealidad comprendido entre 0,1mM y 10mM con un límite de detección de  $S/R=3$  de 0,03mM.



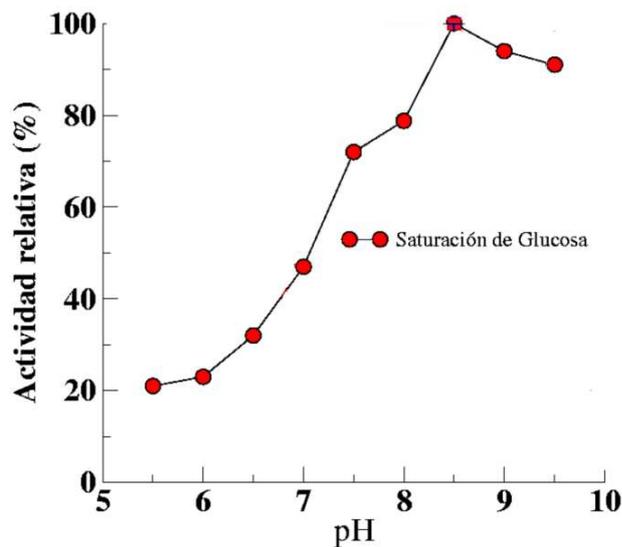
**Fig. 90** Curva de calibración del biosensor preparado con 3mg de micropartículas con 5000 UI/g de GOx.

$$i_{(nA)} = 52_{(nA)} + 157_{(nA/mM)} \times x_{(mM)} \quad (3.24)$$

La ecuación que define este biosensor con un coeficiente de linealidad de 0,991 es:

### Influencia del pH

La influencia del pH, en la respuesta del biosensor preparado con micropartículas de 25 % de PCL y 5000 UI/g de GOx es mostrada en la figura 91.

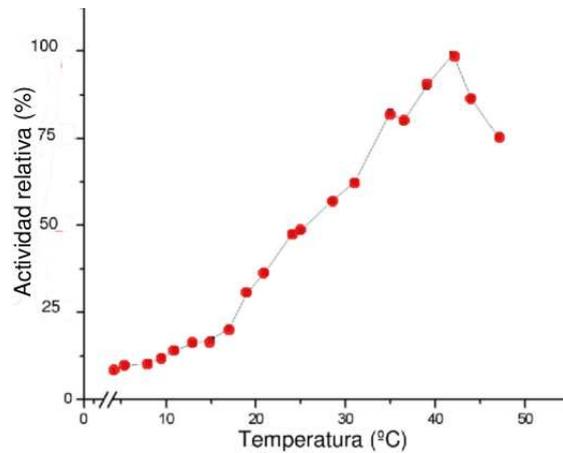


**Fig. 91** Actividad relativa de los biosensores en función del pH de la solución.

Aquí se observa que el máximo de actividad se encuentra a pH 8,5. Por tanto se ha elegido este pH para realizar todas las experiencias. Como se puede comprobar el pH de máxima actividad está muy desplazado con respecto al del enzima libre, lo cual puede ser debido a alteraciones en el microambiente que rodea al enzima inducido por el polímero. Este comportamiento se ajusta a lo observado por otros autores al inmovilizar enzimas en redes poliméricas [55].

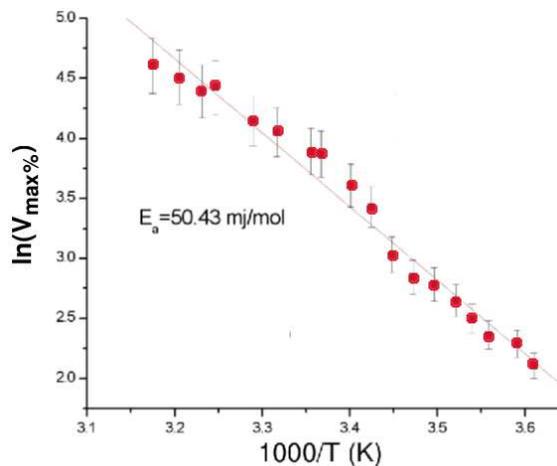
### Influencia de la temperatura

Con el fin de establecer los límites de estabilidad del enzima inmovilizado en las micropartículas, se ha estudiado la actividad relativa en función de la temperatura, tal y como se muestra en la figura 92.



**Fig. 92** Actividad relativa de los biosensores en función de la temperatura.

En la figura anterior se puede observar que la actividad relativa máxima aumenta a medida que lo hace la temperatura de la solución buffer, hasta llegar a una temperatura máxima de 42°C a partir de la cual la actividad empieza a caer de forma brusca.

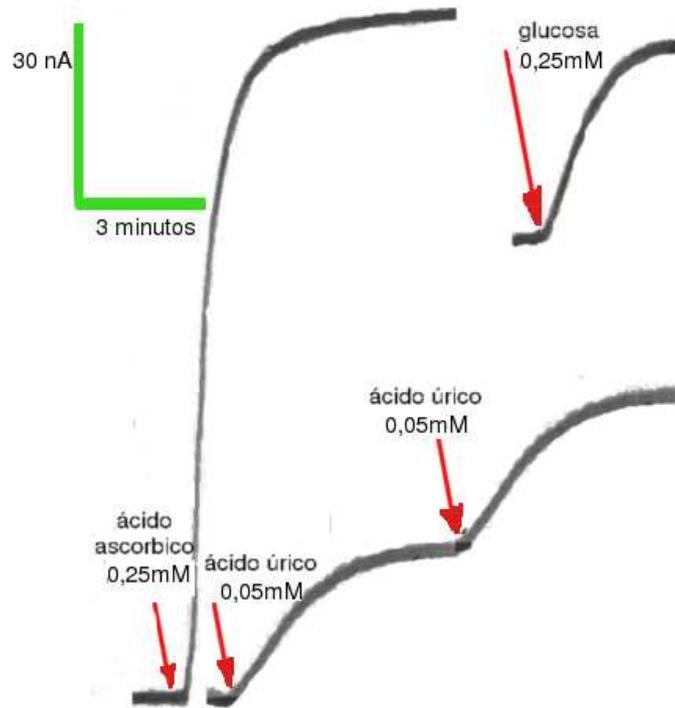


**Fig. 93** Representación de Arrhenius de la actividad de las micropartículas en función de la temperatura.

La figura 93 muestra la representación de Arrhenius de los datos anteriores. De la única pendiente de la representación se ha calculado la  $E_a$  de la reacción catalizada por el enzima inmovilizada. Dicha  $E_a$  es 50kJ/mol, valor superior a los obtenidos en el caso de los hidrogeles de poli(acrilamida) hinchados, pero similar al de los geles colapsados. Este resultado podría deberse a que a bajas temperaturas, cuando la difusión es menor y dominan los fenómenos relacionados con la actividad enzimática, el enzima se encuentra estructuralmente impedido por la red de polímero. El resultado es una  $E_a$  tan alta como en el caso de los hidrogeles. Sin embargo el aumento en la temperatura hace que el efecto observado, sea por una parte debido a fenómenos difusivos y por otra a fenómenos enzimáticos. No obstante, aunque la difusión del sustrato es mejorada con la temperatura, el hecho de que el enzima se encuentre inmovilizado en una matriz polimérica más rígida que las anteriores, sin apenas hinchamiento, hace que el enzima no mejore la restricción impuesta por el polímero, manteniendo por ello, la misma  $E_a$  de activación durante todo el rango de temperaturas analizado.

### 3.3.6. Aplicación en la lectura de sueros.

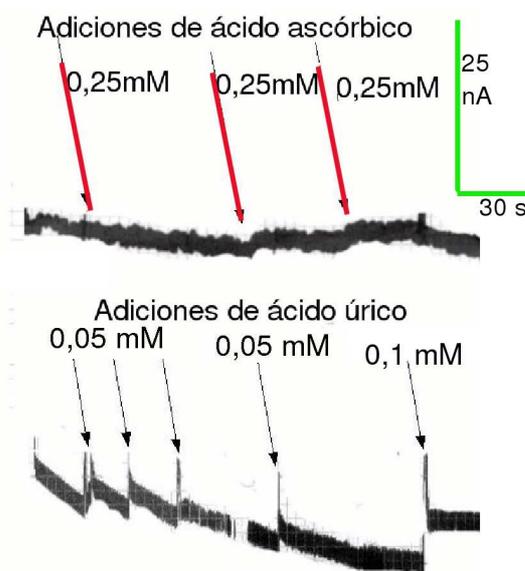
Debido a la ausencia de carga negativa en la superficie de las micropartículas de PCL, es posible que interferentes típicos de la sangre como el ácido ascórbico y el ácido úrico lleguen a la superficie del electrodo, oxidándose y generando una señal interferente, tal como se puede observar en la figura 94.



**Fig. 94** Respuesta del biosensor con micropartículas de PCL en presencia de interferentes.

Con el fin de evitar la aproximación de estas especies interferentes al electrodo, se ha depositado una capa de NAFION®. Este polímero tiene en su estructura gran cantidad de grupos  $-SO_3^+$  que le aporta carga negativa, eliminando la interferencia por repulsión electrostática. La deposición de la lámina de NAFION® se ha realizado sobre un electrodo de platino pulido con alúmina. Sobre este electrodo se han depositado  $50\mu\text{L}$  de una solución de NAFION® al 5%(p/p). Seguidamente el electrodo es calentado a  $75^\circ\text{C}$  durante un período de 1 hora. Una vez que el electrodo se ha enfriado se depositan sobre él 3mg de micropartículas con 25% de PCL, que serán fijadas a la superficie del electrodo utilizando una membrana de diálisis de corte molecular 14,000 daltons. En estas condiciones se obtiene un biosensor insensible a interferentes cargados negativamente como el ácido úrico y ascórbico, al mismo tiempo que mantiene su respuesta al  $H_2O_2$ .

La figura 95 muestra la respuesta de los biosensores propuestos con micropartículas de PCL en presencia de ácido úrico, ácido ascórbico y glucosa. Como se puede observar al depositar la película de NAFION® desaparecen las interferencias en el electrodo, haciendo de éste un biosensor más selectivo a la glucosa.



**Fig. 95** Respuesta del biosensor con lámina de NAFION® en presencia de interferentes.

En el biosensor preparado con NAFION®, la adición de 0,25mM de ácido ascórbico no genera ningún tipo de señal en el electrodo. En el caso de las adiciones de ácido ascórbico 0,05mM, éstas sólo producen una señal que representa el 5% de la obtenida a la misma concentración en un electrodo sin película de NAFION®. Estos resultados nos permiten eliminar las interferencias y medir la concentración de glucosa en sangre. La tabla 12 muestra los resultados obtenidos del análisis de sueros reales comparados con el método de referencia.

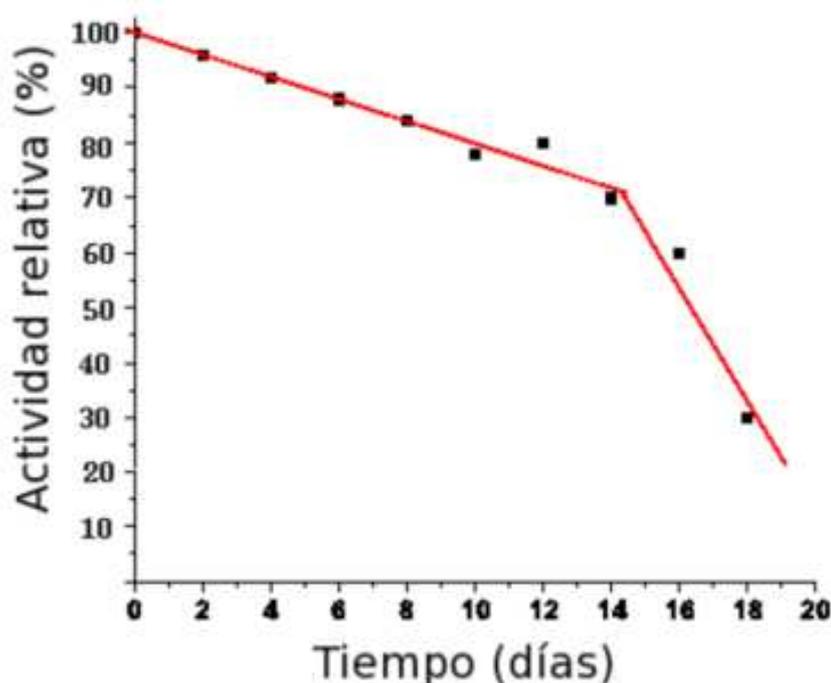
**Tabla 12** Resultados de los análisis de los sueros reales, comparados con el método de referencia.

	Biosensor sin NAFION Glucosa (mg/dl)	Biosensor con NAFION Glucosa (mg/dl)	Método de Referencia Glucosa (mg/dL)
Suero 1	110±1,2	100±2,2	103
Suero 2	81±2,1	74±1,6	72
Suero 3	96±1,5	82±1,8	81

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la selectividad así como la precisión del biosensor preparado con NAFION® es mayor que el mismo sin NAFION® ajustándose más a los resultados obtenidos con el método de referencia de la glucosa hexoquinasa.

### 3.3.7. Estabilidad

Se ha estudiado la estabilidad del biosensor a lo largo del tiempo, con el fin de definir el tiempo útil de este dispositivo. La figura 96 muestra la actividad relativa del biosensor en función del tiempo. en esta gráfica se puede apreciar como la actividad cae ligeramente durante durante las dos primeras semanas, a partir de las cuales la actividad cae de manera brusca, debido tal vez a la descomposición del polímero. Esta descomposición se debe a la hidrólisis de los enlaces éster, proceso que está acelerado cuando el polímero se encuentra a pH básicos [119]



**Fig. 96** Actividad relativa de los biosensores en función del tiempo.

# Capítulo 4

## Biosensores de segunda generación

### 4.1. Micropartículas de poli(acrilamida)-polipirrol en el desarrollo de biosensores amperométricos.

Se han sintetizado micropartículas conductoras de poli(acrilamida-pirrol) en las que se ha inmovilizado la GOx para desarrollar biosensores de glucosa de segunda generación. Se ha empleado polipirrol como intermediario de electrones entre el enzima y la superficie del electrodo con la idea de mejorar las prestaciones del electrodo en cuanto a sensibilidad, selectividad y tiempo de respuesta.

#### 4.1.1. Preparación del polipirrol

El polipirrol es un polímeros insoluble en agua, pero que puede ser dispersado en disoluciones acuosas mediante la adición, durante su síntesis, de poliestiren-sulfonato sódico [111]. La cadena de polipirrol en crecimiento forma, en estas condiciones, un complejo soluble con la cadena del poliestiren-sulfonato. Para sintetizar el polipirrol disperso en agua se utiliza un reactor de dos bocas, en el que se introducen 200ml de una disolución formada por poliestiren-sulfonato (0,27g/ml), persulfato de amonio (1,5M) y HCl (0,1M). Sobre esta disolución, bajo agitación vigorosa y en atmósfera inerte de  $N_2$ , se añade 20g de pirrol lentamente. A medida que el pirrol se disuelve en la disolución, reacciona con el persulfato de amonio, polimeriza y forma un complejo soluble con el poliestirensulfonato previamente disuelto en esa disolución. La reacción se mantiene durante 4 horas obteniéndose finalmente una dispersión de polipirrol-poliestirensulfonato de color oscuro.

Durante la reacción de polimerización, el HCl presente en la disolución junto con los dos  $H_3O^+$  liberados por cada monómero de pirrol que reacciona, hacen que el pH de la disolución resultante sea excesivamente bajo, por esta razón y con el fin de obtener una disolución con un pH 7, se neutraliza utilizando NaOH. Una vez neutralizada la disolución se concentra en un rota-vapor a 30 °C y en vacío, hasta que su volumen sea aproximadamente de 100ml. Terminado el proceso se obtiene una dispersión de polipirrol-poliestirensulfonato a pH 7 con una concentración de

polímero conductor de 20g/100ml. El poliestirensulfonato tiene un doble papel, por una parte estabiliza la red de polipirrol para que permanezca dispersa en agua y por otra dopa al polipirrol proporcionándole las propiedades conductoras.

#### 4.1.2. Síntesis de las micropartículas de poli(acrilamida)-polipirrol, (PAPPy)

Las micropartículas de PAPPy se sintetizaron por polimerización desde emulsiones concentradas, dispersando la cantidad en peso deseada de polímero conductor previamente sintetizado en la fase acuosa, así se obtiene una emulsión concentrada de color negro. La tabla 13 muestra los componentes de la emulsión concentrada.

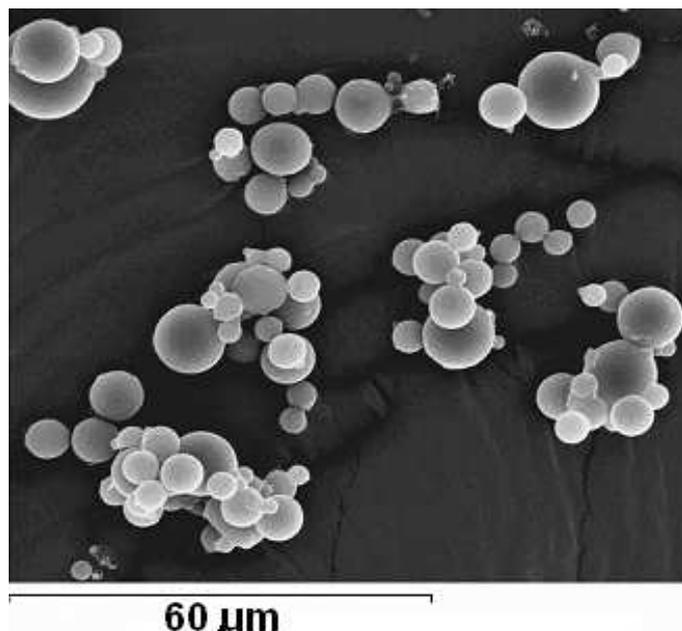
**Tabla 13.** Composición de las diferentes fases de la emulsión precursora de las micropartículas de PAPPy.

<b>Fase oleosa</b>		13,89%
Dodecano	750 $\mu\text{L}$	10,42%
Span 80	250 $\mu\text{L}$	3,47%
<b>Fase acuosa</b>		86,11%
solución reguladora Fosfato	5 mL	86,11%
GOx	250 mg	
Acrilamida	1,25mg	3,5M
NN-metilen-bisacrilamida	40mg	88mM
polipirrol	500 $\mu\text{L}$	20 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$
NN'-tetrametil-etilen-diamina	100 $\mu\text{L}$	62mM

Sobre la emulsión concentrada anteriormente preparada se añade el catalizador de la reacción de polimerización el TEMED. El sistema se mantiene en agitación durante 45 minutos, tiempo suficiente para que se complete la polimerización. Finalmente se extraen las micropartículas de igual modo que en el capítulo 3. Se ha definido  $PPy\%$ , porcentaje de polipirrol en las micropartículas como:

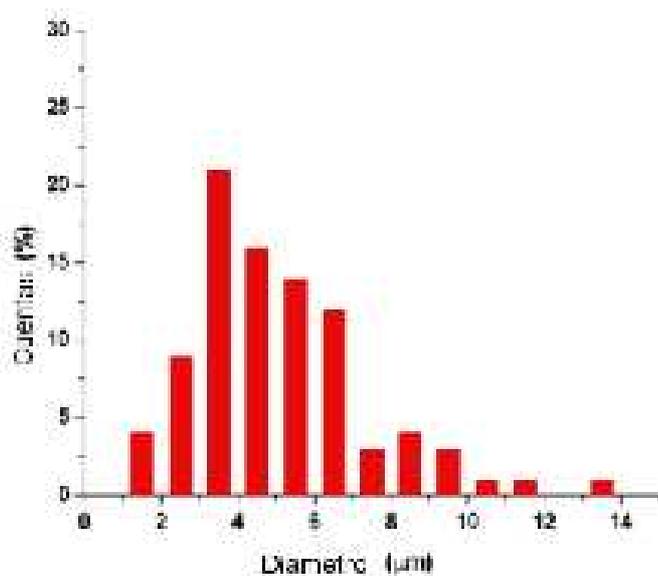
$$PPy\% = \frac{PPy_{(g)}}{PPy_{(g)} + PA_{(g)}} \quad (4.1)$$

Donde  $PPy_{(g)}$  es la cantidad de polipirrol en gramos dispersado durante la síntesis y  $PA_{(g)}$  es la cantidad de acrilamida en gramos utilizada durante la síntesis. Al final del proceso de polimerización obtenemos micropartículas de PAPPy como las mostradas en la figura 97.



**Fig. 97** Micropartículas PAPPy con GOx en su interior y un 30% de polipirrol .

La figura 98 muestra las diferentes poblaciones de micropartículas que aparecen tras la síntesis.



**Fig. 98** Estudio poblacional de las micropartículas de PAPPy con un 30% polipirrol y GOx en su interior.

Como se puede ver aparecen dos poblaciones de micropartículas, con tamaños promedios de 3,5μm y 8,5μm respectivamente. Al comparar con las micropartículas de poli(acrilamida), parece que la inclusión del polipirrol produce desplazamiento en el tamaño de las poblaciones de micropartículas.

### 4.1.3. Análisis estructural de las micropartículas de PAPPy.

#### Caracterización mediante espectroscopia UV-visible.

La capacidad de los materiales para conducir la electricidad está relacionada con su estructura electrónica. Los electrones sólo pueden moverse dentro del material si hay huecos en los orbitales atómicos. En un metal, los orbitales atómicos se solapan con los equivalente de átomos vecinos, formando las denominadas bandas de energía. Dependiendo de la naturaleza de los orbitales solapados tenemos dos tipos diferentes de bandas de energía que son bandas de valencia y bandas de conducción respectivamente. Las bandas de valencia proceden del solpamiento de orbitales enlazantes o de mínima energía. Estos orbitales concentran la mayor parte de los electrones del átomo, razón por la que son denominados orbitales HOMO, "*High occupied molecular orbital*". Mientras que los orbitales antienlazantes, que son de mayor energía y permanecen vacíos de electrones, son denominados LUMO "*Low occupied molecular orbital*". Para que exista conductividad en un material es necesario promocionar los electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción, lo que requiere superar una barrera energética impuesta por la distancia de separación existente entre las bandas de valencia hacia la banda de conducción. La energía necesaria para realizar esa transición se denomina energía de separación entre banda,  $E_g$ , y es clave en la conductividad de los materiales, ya que para que los electrones puedan moverse libremente es necesario que la  $E_g$  sea la menor posible.

Con el fin de medir la  $E_g$  del polipirrol anteriormente sintetizado se ha empleado un espectroscopio de UV-visible, con el que se ha estudiado la absorción en la región comprendida entre 2 y 7eV, figura 99.

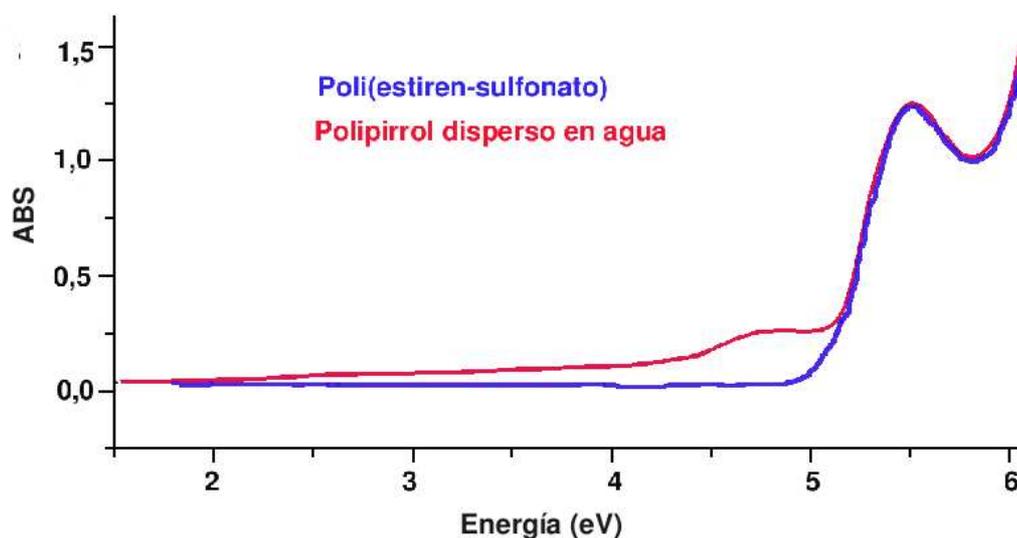


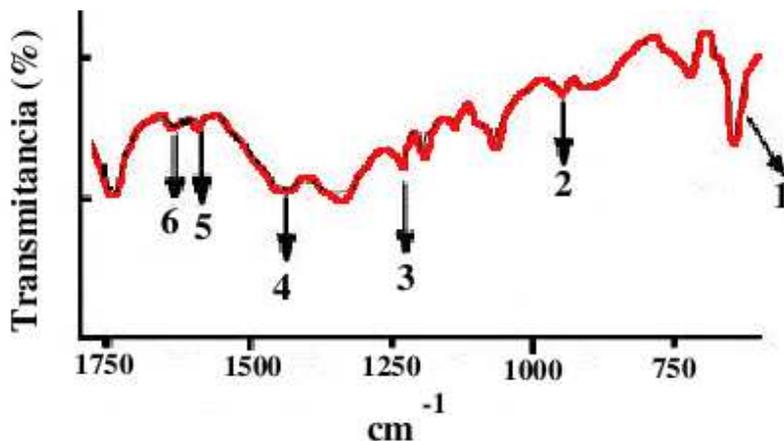
Fig. 99 Espectro de absorción del polipirrol dispersado en agua.

En la figura 99, al comparar el espectro de absorción del polipirrol disperso en agua con el del poliestiren-sulfonato se puede apreciar la presencia de dos zonas de absorbancia únicas para el polímero conductor. La primera de estas zonas, es

un ligero aumento de la absorbancia que llega a asintota a partir de 3,5 eV, y que podría corresponderse con la  $E_g$  del polipirrol en estado bipolaron. A continuación se observa un incremento de la absorbancia aun mayor a partir de 4,5eV el cual podría estar relacionado con la  $E_g$  del polipirrol en estado de polarón [194, 217, 218].

### Espectroscopia de infrarrojos.

Una vez realizada la síntesis de las micropartículas de PAPPy se ha estudiado mediante espectroscopia de infrarrojo, la presencia de los grupos característicos del polipirrol en la red de poli(acrilamida), figura 100.

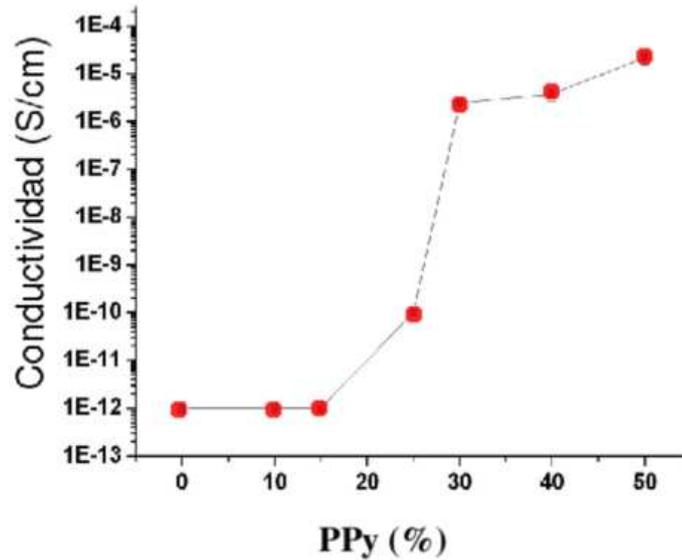


**Fig. 100** Espectro infrarrojo de transmisión de muestras de micropartículas de poli(acrilamida) con un 50 % polipirrol.

Como se puede apreciar cuando las muestras presentan un porcentaje de un 50 % PPy aparecen las bandas típicas del polipirrol tales como: 1) banda polarón a  $646\text{ cm}^{-1}$ , 2) banda bipolaron a  $978\text{ cm}^{-1}$ , 3) y 4) modos de vibración del anillo de pirrol a  $1236\text{ cm}^{-1}$  y  $1478\text{ cm}^{-1}$ , 5) y 6) vibración de tensión del C=C a  $1565\text{ cm}^{-1}$  y  $1619\text{ cm}^{-1}$  [112].

### Determinación de la conductividad en las micropartículas de PAPPy.

La conductividad de las micropartículas ha sido medida utilizando el método de las cuatro puntas. Este método consiste en la medida de la conductividad en una sección transversal sobre la que se está aplicando un campo eléctrico determinado. Para ello se han empleado discos de diámetro 1,3cm y espesor 2mm de micropartículas prensadas a  $2 \times 10^7$  Pa durante 1 minuto. En general los polímeros aislantes presentan conductividades del orden de  $1 \times 10^{-12}$  S/cm, mientras que los polímeros más conductores, como la polianilina dopada o el poliacetileno dopado, presentan conductividades comprendidas entre  $1 \times 10^3$  S/cm y  $1 \times 10^4$  S/cm. En el caso de las micropartículas de poli(acrilamida) su conductividad tal, y como se observa en la figura 101, depende del porcentaje de PPy atrapado en su interior.



**Fig. 101** Conductividad de las micropartículas de PAPPy en función de PPy %.

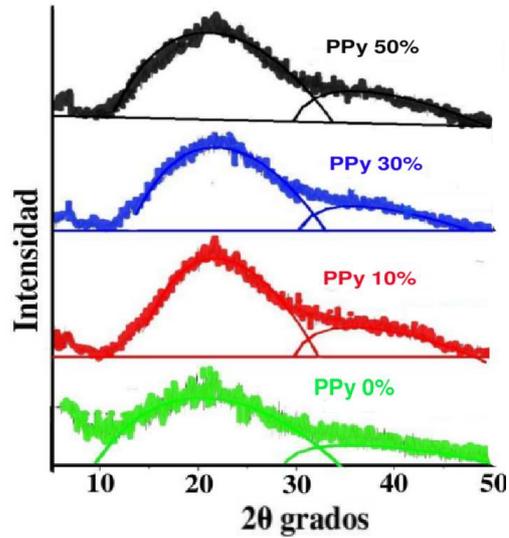
Tal y como se puede ver en la figura anterior, la conductividad de las micropartículas aumenta de forma súbita cuando PPy % es del 30 %. A partir de esta concentración se obtienen micropartículas cuyas conductividades se sitúan entorno a  $1 \times 10^{-5} \text{S/cm}$ , dentro de la zona de semiconducción. Es importante destacar que la conducción mediada por polímeros conductores se realiza en dos direcciones: lineal e intercatenaria. La primera utiliza las bandas de conducción del polímero como vehículo para los electrones. Sin embargo este tipo de conducción eléctrica se encuentra limitada por la longitud de la cadena, siendo entonces necesario, un segundo proceso, que alargue la conductividad a toda la micropartícula. Este segundo proceso depende en gran medida de la capacidad de transporte de carga entre cadenas. Esta capacidad viene definida por la constante de transferencia de carga  $k_t$ , la cual depende de la distancia de separación de las cadenas,  $d$ , según la ecuación:

$$k_t = A \times e^{-d/\nu} \quad (4.2)$$

Donde  $K_t$  es la constante de transferencia de la carga,  $A$  es un factor de frecuencia,  $\nu$  es un parámetro relacionado con la anchura de la región entre cadenas enfrentadas y  $d$  es la distancia entre cadenas. La ecuación anterior, indica que a medida que disminuye la distancia entre las cadenas de PPy en la micropartícula la conductividad aumenta de forma exponencial. Esta expresión sirve para explicar el brusco incremento de la conductividad cuando el contenido de PPy es del 30 %.

### Caracterización mediante difracción de Rayos-X.

Se ha realizado difracción de rayos X barriendo la región angular comprendida entre los  $2\theta=3$  y  $2\theta=50$  grados. La figura 102 muestra los difractogramas obtenidos en micropartículas con diferentes proporciones de polímero conductor. En todos los casos los difractogramas registrados presentan un perfil amorfo, con 2 halos centrados a  $2\theta=21$  y  $2\theta=39$  grados respectivamente.

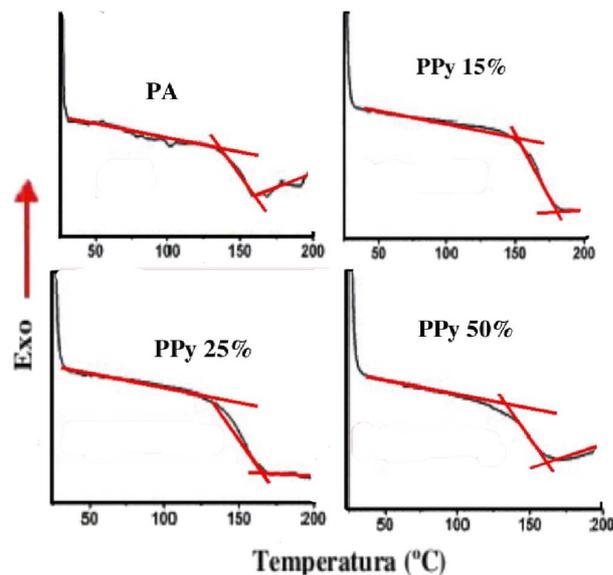


**Fig. 102** Difracción de rayos X de micropartículas de poli(acrilamida) con diferente contenido en polipirrol.

Estas distancias se corresponden, según la ley de Bragg, a  $4.40\text{\AA}$  y  $2.29\text{\AA}$  respectivamente. Los resultados obtenidos muestran una estructura amorfa similar a la de las micropartículas de poli(acrilamida).

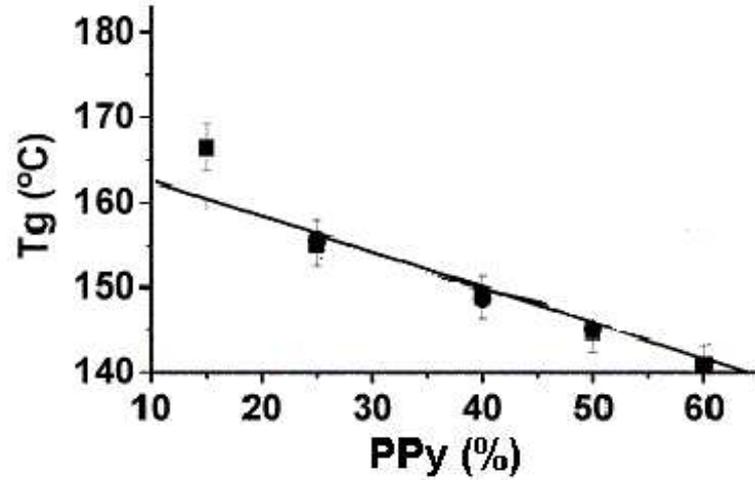
### Calorimetría diferencial de barrido en las micropartículas de PAPPy.

Para llevar a cabo el estudio térmico de las micropartículas de PAPPy con GOx en su interior las muestras fueron sometidas a un proceso de estandarización. Se tomó siempre una cantidad de micropartículas comprendida entre 5-8mg que fueron calentadas a  $150^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos con el fin de eliminar el agua que queda almacenada en las micropartículas.



**Fig. 103** Registros calorimétricos de micropartículas con GOx de poli(acrilamida) y PAPPy.

En la figura 103 se muestra el termograma de micropartículas con GOx de poli(acrilamida) y de PAPPy con  $\chi=3,2\%$ . Al representar la  $T_g$  obtenida en función de PPy % manteniendo constante el grado de reticulación se obtiene la representación de la figura 104.



**Fig. 104**  $T_g$  de las micropartículas en función de PPy % inmovilizado con GOx en su interior.

En la figura 104 se puede observar como la  $T_g$  del polímero disminuye a medida que aumenta PPy %. Este fenómeno ha sido atribuido a la disminución en la relación poli(acrilamida)/GOx que se produce cuando aumenta la cantidad de PPy % en la micropartícula. Por otro lado no ha habido cambios en la temperatura de descomposición que se ha mantenido cercana a los 280°C.

#### 4.1.4. Desarrollo de biosensores amperométricos con micropartículas de PAPPy

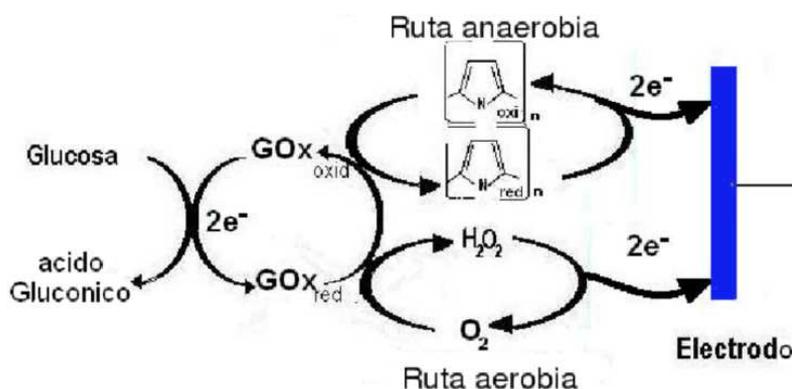
Se han preparado biosensores amperométricos usando las micropartículas conductoras de PAPPy como componentes biológicos de biosensores amperométricos. Para realizar los biosensores se ha pesado en todos los casos 3mg de micropartículas de PAPPy y se han fijado a la superficie del electrodo de platino mediante una membrana de diálisis de corte 14000.

#### 4.1.5. Factores que influyen en la respuesta amperométrica del biosensor.

Se ha estudiado como influye la cantidad de polímero conductor, la cantidad de GOx inmovilizada, el grado de reticulación, el pH y la temperatura, en la respuesta del biosensor.

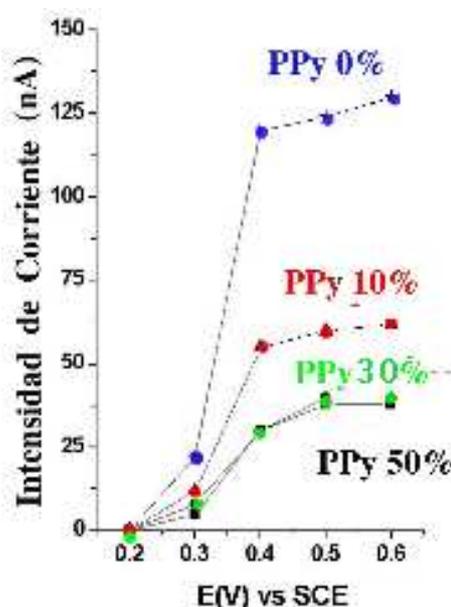
##### Influencia del contenido de polipirrol.

En ausencia de mediadores rédox, cualquier biosensor amperométrico de glucosa, en el que se ha inmovilizado la GOx, emplea el  $O_2$  disuelto en el medio como aceptor de electrones, generando  $H_2O_2$  como producto de la reacción enzimática. Éste, como se explicó en capítulos anteriores, es oxidado a potenciales cercanos a 0,6V vs. Ag/AgCl en la superficie del electrodo de platino, generando como resultado una corriente eléctrica. Sin embargo, la incorporación de un polímero conductor en el sistema de inmovilización, permite el transporte de electrones desde la enzima hasta la superficie del electrodo, utilizando como aceptor de los electrones el polímero conductor. Este fenómeno de transferencia de carga, tan usual en enzimas del grupo hemo [151, 219, 220] implica una conexión directa entre el centro activo de la GOx y el polímero conductor [153]. En este caso el polímero conductor sustituye al  $O_2$  como aceptor de electrones, comportándose como un mediador. En la figura 105 se muestra de forma esquemática una posible ruta de transferencia de electrones mediante el polímero conductor.



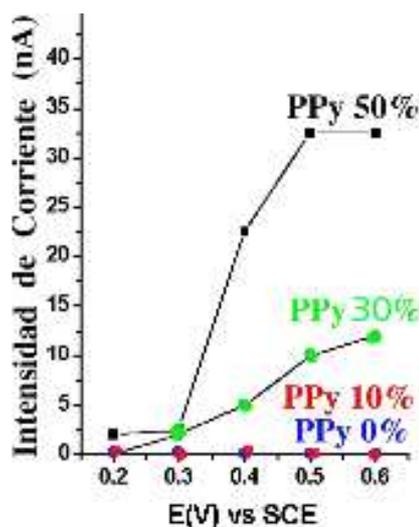
**Fig. 105** Esquema de la transferencia de electrones desde el centro activo de la enzima hasta el electrodo en presencia y ausencia de polímero conductor.

Por ello, y con el fin de confirmar la conexión entre el electrodo y el centro activo del enzima a través del polímero, se ha estudiado la señal de los biosensores preparados con micropartículas con diferentes porcentajes de *PPy* en función del potencial de trabajo, tanto en presencia como ausencia de oxígeno.



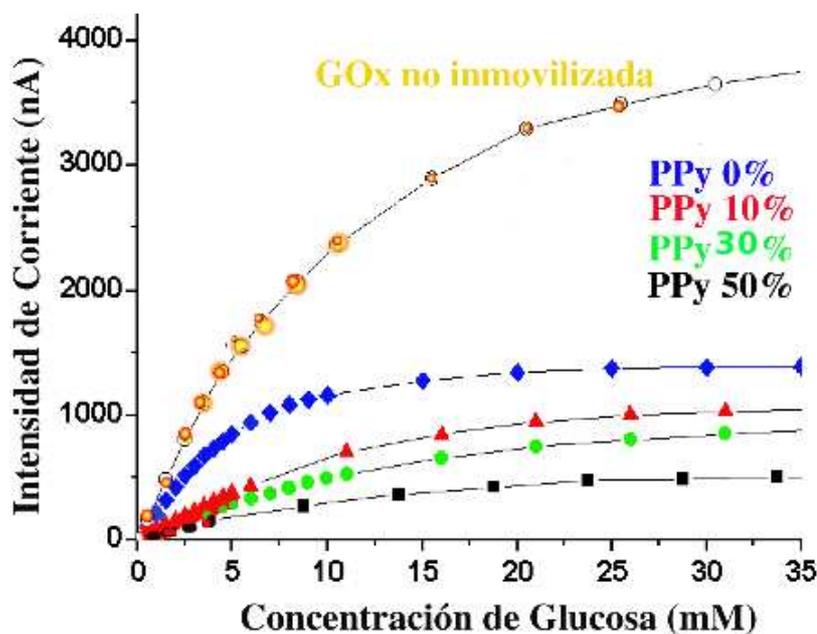
**Fig. 106** Voltamperometría hidrodinámica de biosensores amperométricos preparados con micropartículas con diferentes contenidos de *PPy*, en presencia de  $O_2$

Como se puede observar en la figura 106, en condiciones aerobias, la respuesta a la glucosa generada por los biosensores sin *PPy* es mayor que la de aquellos con *PPy*. Esto podría deberse a que el *PPy* estuviese bloqueando el centro activo del enzima, dificultando así su capacidad catalítica y/o la difusión del sustrato. Esto justificaría el descenso en la señal a medida que aumenta el contenido de *PPy*.



**Fig. 107** Voltamperometría hidrodinámica de biosensores amperométricos preparados con micropartículas con diferentes *PPy*, en ausencia de  $O_2$ .

La figura 107 muestra la respuesta del biosensor en condiciones anaerobias que es nula en el caso de las micropartículas de poli(acrilamida). Aquí al contrario de lo que pasaba en condiciones aerobias, se observa un aumento en la respuesta del biosensor conforme aumenta el contenido en PPy. La presencia del PPy en la cercanía del centro activo del enzima facilitaría que ésta pudiera utilizar el polímero conductor en la transferencia de electrones, generando una señal a la glucosa. Estos resultados nos llevaron a elegir las micropartículas con 50 % PPy como material óptimo para preparar los biosensores.



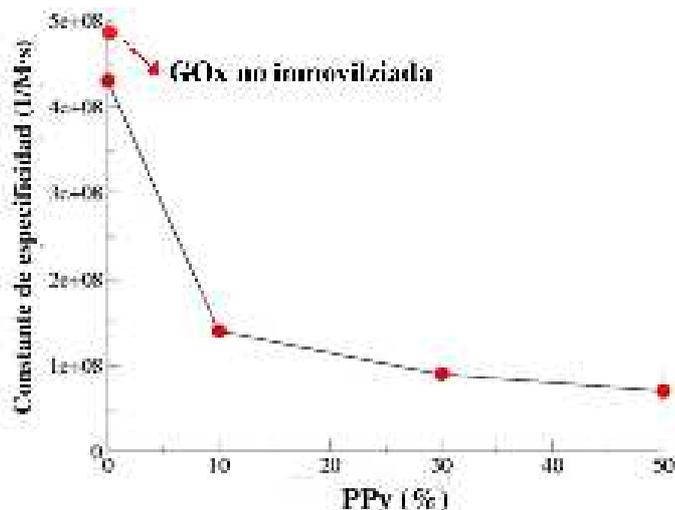
**Fig. 108** Influencia del PPy % en las curvas de calibración de los biosensores.

Comenzamos evaluando como afecta el PPy a la cinética enzimática. Al calcular el índice de Hill a partir de las curvas de calibración se observa como varía a medida que aumenta el porcentaje de polímero introducido en las micropartículas, tabla 14.

**Tabla 14** Índice de Hill obtenido de las curvas de calibración.

Porcentaje de PPy %	índice de Hill
0	1,2
10	1,3
30	1,1
50	1,1

Como se puede apreciar los índices de Hill obtenidos están cercanos a 1, lo que indica que la cinética de la enzima inmovilizada se ajusta a un comportamiento de Michaelis-Menten. En la figura 108 se aprecia como el incremento del porcentaje de PPy provoca una disminución en la  $V_{max}^{ap}$ . Esto puede ser debido al incremento de la rigidez del polímero como consecuencia de la introducción del polímero conductor en la matriz de poli(acrilamida). Fenómenos similares han sido observados en nanopartículas de nipam-polipirrol [54]. Este incremento en la rigidez produciría el descenso observado en la  $K_{esp}$  tal y como se muestra en la figura 109.

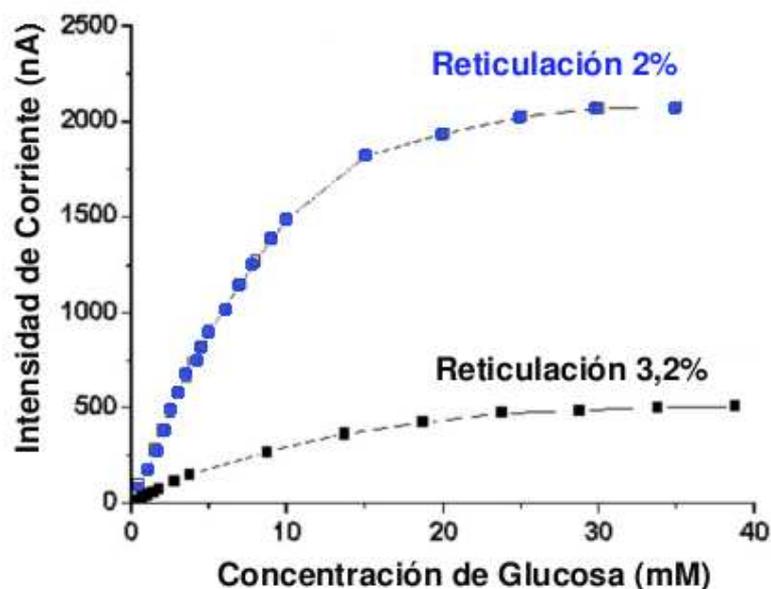


**Fig. 109**  $K_{esp}$  de la enzima inmovilizada en las micropartículas conductoras en función de  $PPy$ .

Estos resultado indican que aunque estas micropartículas tienen la capacidad de emplear el polipirrol como mediador en condiciones anaerobias, el aumento en la rigidez de la red así como de la cinética difusiva disminuye la probabilidad de choques entre el enzima y el sustrato lo que provoca un descenso de la  $K_{esp}$ .

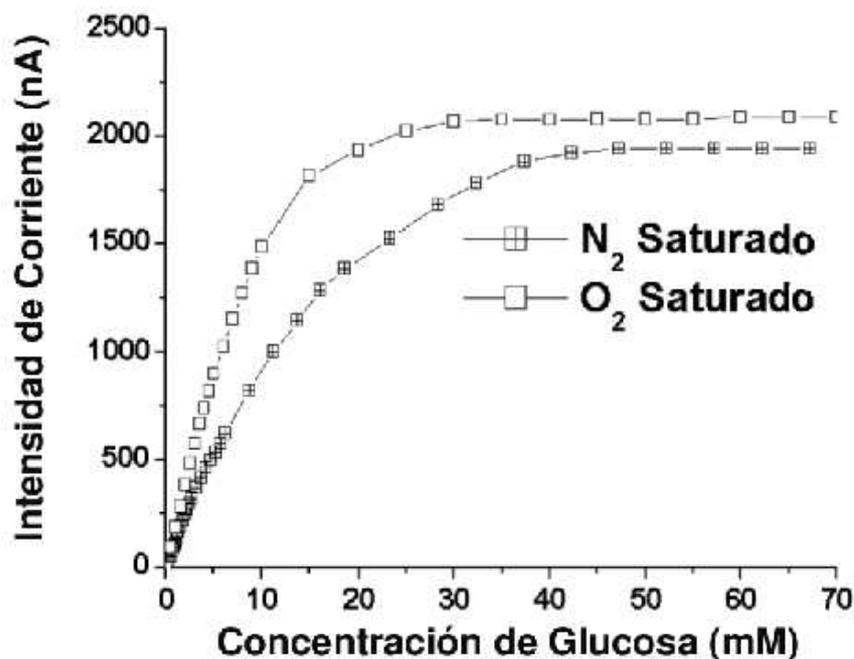
### Influencia del grado de reticulación en la señal del biosensor

Como consecuencia de los resultados anteriores, el  $PPy$  óptimo para la conducción en las micropartículas es del 50%. Sin embargo este porcentaje presenta problemas derivados de la rigidez y para solucionarlos hemos disminuido el grado de reticulación de las micropartículas desde 3,2% al 2%.



**Fig. 110** Curva de calibración de biosensores con micropartículas conductoras y grado de reticulación 3,2% y 2%.

Como se muestra en la figura 110, al disminuir el grado de reticulación aumenta la  $V_{max}^{ap}$  pasando de 500 nA a 2100 nA. Por otro lado la  $K_{esp}$  sufre un aumento desde  $1 \times 10^8 1/M.s$  hasta  $4 \times 10^8 1/M.s$  lo que supone una clara mejoría en las propiedades analíticas de las micropartículas. Se han elegido las micropartículas de 50% de PPy y grado de reticulación 2% como las óptimas para desarrollar los biosensores. En la figura 111 se muestra el comportamiento de los mismos en condiciones aerobias y anaerobias.

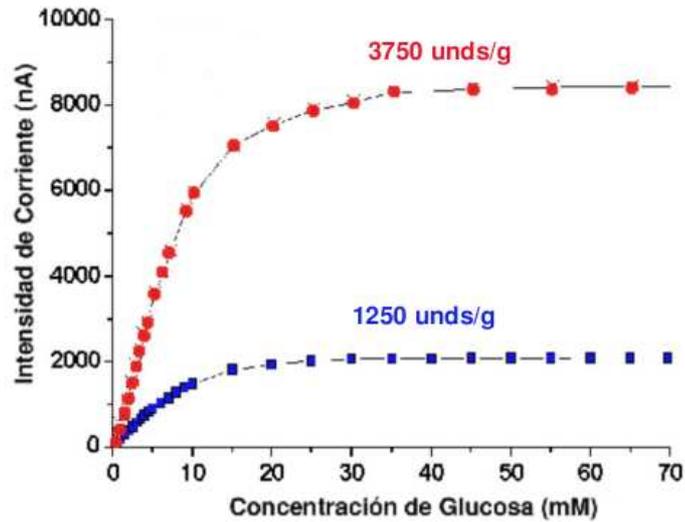


**Fig. 111** Curva de calibración de biosensor con micropartículas conductoras con grado de reticulación 2% y 50% de PPy, en condiciones aerobias y anaerobias.

Podemos observar que la curva de calibración del biosensor en condiciones anaerobias, es decir sin  $O_2$ , en la disolución, difiere levemente de la misma curva en condiciones aerobias. Esto apoya la interpretación de que en ausencia de oxígeno los electrones son transportados desde el centro activo del enzima hasta el electrodo utilizando el polímero conductor. La diferencia entre las curvas podría deberse a que la eficiencia para ceder los electrones de la reacción es mayor cuando se emplea  $O_2$  que cuando se emplea el PPy.

### Influencia de la carga enzimática de las micropartículas

Con el fin de aumentar el intervalo de linealidad se ha incrementado la cantidad de GOx inmovilizada desde 1250UI/g hasta 3750UI/g. La respuesta de sendos biosensores se muestran en la figura 112.



**Fig. 112** Curva de calibración de biosensor con micropartículas conductoras con diferentes cantidades de GOx inmovilizada.

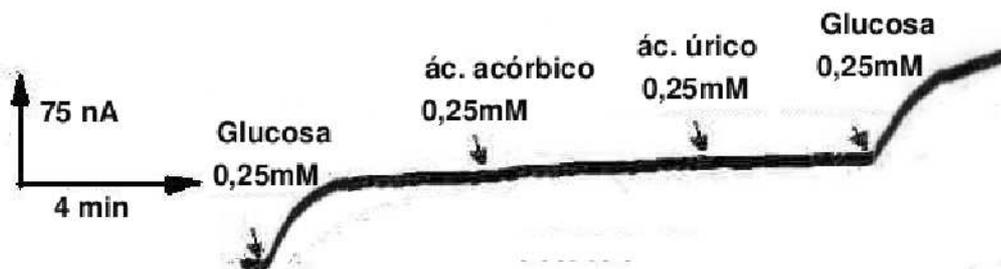
Como se puede ver en esta figura, al aumentar la cantidad de enzima inmovilizada, el límite de linealidad se incrementa. En el caso de las micropartículas con 1250UI/g de GOx, la intensidad de corriente se mantiene lineal entre 0,1mM y 6mM, con un límite de detección  $S/R=3$  de 0,03mM. La ecuación que define la región lineal del biosensor con un coeficiente de correlación de 0,997 es:

$$y_{(nA)} = 22_{(nA)} + 176_{(nA/mM)} \times x_{(mM)} \quad (4.3)$$

Mientras en el caso de las micropartículas cargadas con 3750UI/g la intensidad de corriente se mantiene lineal en el intervalo comprendido entre 0,033mM y 10mM con un límite de detección  $S/R=3$  de 0,01mM. La ecuación que define al biosensor con un coeficiente de correlación de 0,997 es:

$$y_{(nA)} = 55_{(nA)} + 656_{(nA/mM)} \times x_{(mM)} \quad (4.4)$$

Cabe resaltar que los biosensores resultantes tienen tiempos pequeños de respuesta que llegan a ser en algunos casos de 11 s. Además, como ya ocurría en los biosensores de poli(acrilamida-acrílico), la carga negativa aportada a la micropartícula, en este caso por las cadenas de poli(estiren-sulfonato), producen por repulsión electrostática la eliminación de interferentes tales como el ácido ascórbico y el ácido úrico tal como se ilustra en la figura 113.

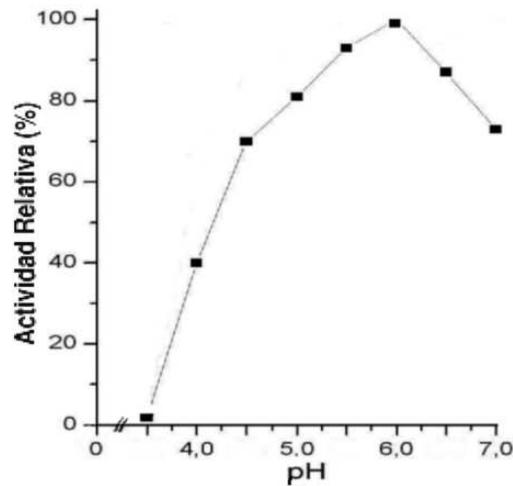


**Fig. 113** Registros amperométricos en presencia de interferentes.

El resultado del registro demuestra que el biosensor no responde a los interferentes, lo que pone de manifiesto la selectividad del sistema propuesto.

### Influencia del pH

La figura 114 muestra la respuesta del biosensor en función del pH de la solución.

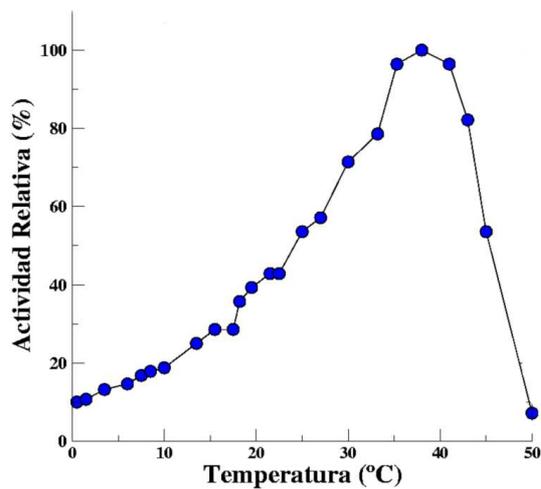


**Fig. 114** Respuesta relativa del biosensor en función del pH.

La figura 114 pone de manifiesto que el máximo de actividad relativa se encuentra a pH 6. Idéntico resultado que en el caso de las micropartículas de poli(acrilamida). Estos datos indican que el enzima inmovilizada apenas varía su comportamiento con respecto al enzima libre.

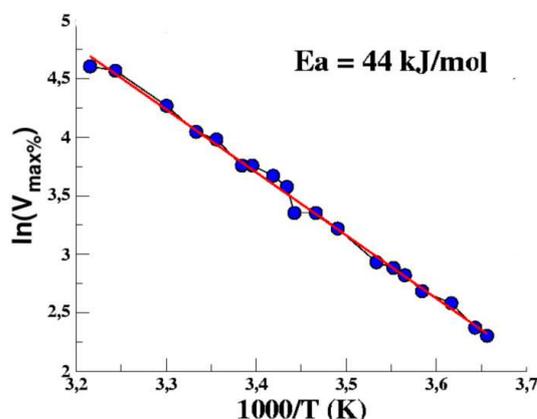
### Influencia de la temperatura.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura en la actividad de la enzima inmovilizada dentro de las micropartículas y la respuesta del biosensor se muestra en la figura 115.



**Fig. 115** Respuesta relativa del biosensor en función de la temperatura.

Tal y como se observa, la actividad relativa alcanza un máximo a 40 °C, temperatura a partir de la cual la actividad empieza a decaer. El plot de Arrhenius de los datos anteriores se muestra en la figura 116.



**Fig. 116** Representación de Arrhenius de la actividad relativa en función de la temperatura.

De la pendiente de la representación anterior se obtiene que la  $E_a$  para el enzima inmovilizada es de 44,04 kJ/mol. Esta  $E_a$  podría ser debida al impedimento estérico que la red de polímero ejerce sobre el enzima, de forma análoga a lo ocurrido para el caso de las micropartículas de poli(acrilamida) con alto grado de reticulación. La presencia de una única pendiente podría deberse a la ausencia de fenómenos de hidratación debido a la estabilización de la red polimérica llevada a cabo por el polipirrol, a diferencia de lo que sucedía en el caso de las micropartículas de poli(acrilamida), ya que el PPy es un polímero rígido y sin procesos de hidratación que mantiene la estructura del polímero sin apenas variaciones con la temperatura.

#### 4.1.6. Aplicación de los biosensores.

Se ha empleado el biosensor preparado con las micropartículas conductoras como sistema para la determinación de glucosa en sueros humanos. Para realizar este experimento se han tomado 4 sueros humanos en los que se ha determinado la concentración de glucosa mediante el método analítico de referencia y empleando los biosensores con micropartículas conductoras. La tabla 15 muestra los resultados obtenidos por uno y por otro método.

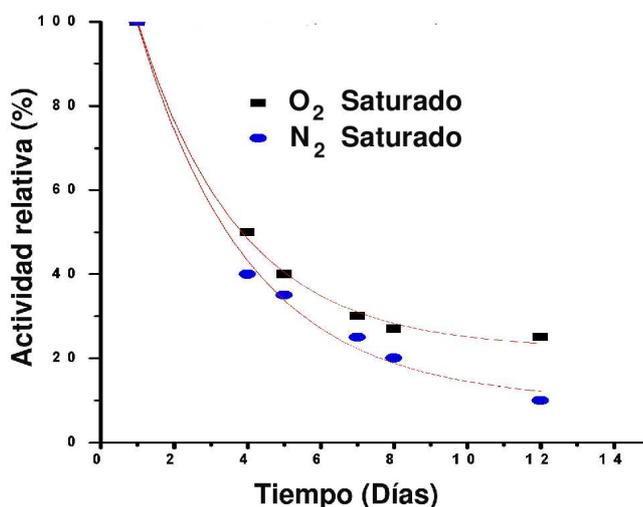
**Tabla 15** Resultados de glucosa de los sueros comparados con el método de referencia.

Muestra	Concentración de Glucosa (mg/dL) Biosensor	Concentración de Glucosa (mg/dL) Método de referencia
1	88,2 ± 0,1	81 ± 0,05
2	82,8 ± 0,1	84,8 ± 0,05
3	100 ± 0,2	100,8 ± 0,05
4	91 ± 0,1	91,6 ± 0,05

Como se puede apreciar, los valores obtenidos por el biosensor son iguales (dentro del error experimental) a los obtenidos por el método de referencia de la hexoquinasas.

#### 4.1.7. Estabilidad de los biosensores.

Se ha estudiado la actividad de los biosensores en función del tiempo y los resultados se presentan en la figura 117.



**Fig.117** Estabilidad del biosensor en condiciones aerobias y anaerobias en función del tiempo.

La actividad relativa del biosensor cae bruscamente en los 10 primeros días de uso, tanto para las medidas aerobias como para las anaerobias. Se ha comprobado que este resultado es debido a la desnaturalización del enzima inmovilizado durante la estabilización del potencial de lectura. En este proceso se genera una corriente eléctrica que pasa por el electrodo de trabajo hasta el electrodo auxiliar. En el caso de las micropartículas de poli(acrilamida), al ser la matriz polimérica aislante, la enzima no se ve afectada por este sobrepotencial, mientras que en el caso de las micropartículas con PPy la corriente es transferida hacia la matriz polimérica, llegando hasta el enzima desnaturalizándolo. Experimentos realizados utilizando filtros de sobrepotencial han permitido eliminar la sobrecorriente obteniéndose estabilidades de al menos 15 días.

# Capítulo 5

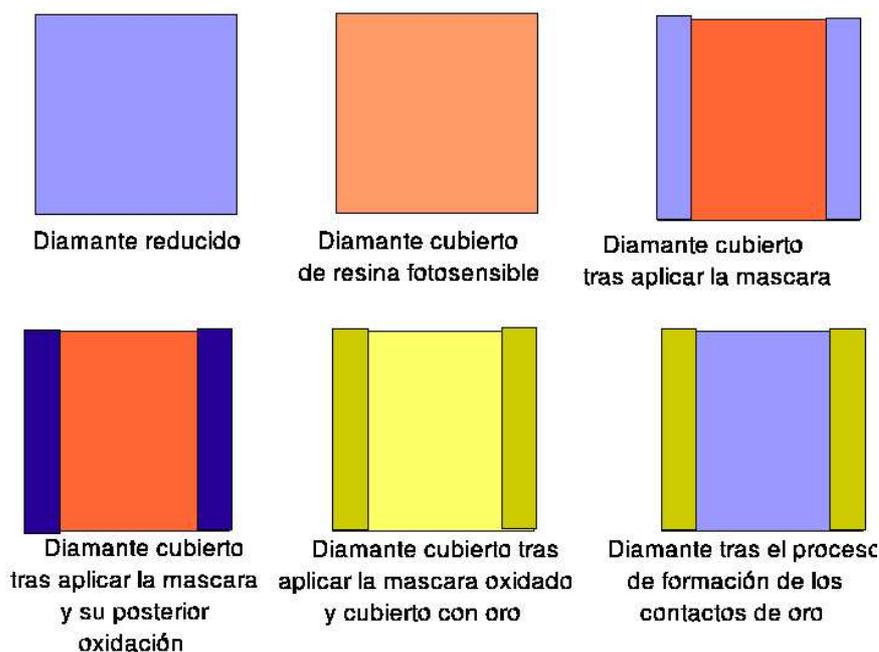
## Biosensores de Tercera Generación

### 5.1. Diamante nano cristalino en el desarrollo de biosensores de 3<sup>a</sup> generación

El diamante es un material altamente estable frente a gran cantidad de productos químicos, por ello es un candidato atractivo para ser empleado en el desarrollo de sensores químicos y bioquímicos. La gran dureza del diamante, su baja reactividad química, su alta conductividad térmica así como la posibilidad de conductividad p y n, hacen del diamante si no el mejor, si la mejor opción para ser utilizado como material electródico. Además, como el diamante no sufre alteraciones químicas en su superficie cuando es sometido a un amplio rango de potenciales, no es necesario la apasivación, requerida para otros materiales como el silicio. Ello nos ha llevado a utilizar diamante nanocristalino (NCD) como material electródico, aplicandolo posteriormente al desarrollo de biosensores de 3<sup>a</sup> generación.

#### 5.1.1. Desarrollo de electrodos de diamante nanocristalino, NCD

El desarrollo de los electrodos de diamante sobre los que se van a realizar todos los procesos siguientes está basado en la utilización de la técnica litográfica. Con esta técnica es posible obtener electrodos con una superficie aproximada de  $1 \text{ mm}^2$ . Antes de comenzar el proceso es necesario limpiar la superficie por tratamiento durante 5 minutos con plasma de oxígeno. Una vez completado este primer paso, la muestra es hidrogenada mediante un tratamiento basado en calentamiento a  $700^\circ\text{C}$  y bombardeo con radicales H, generados al pasar un flujo de  $H_2$  a través de un alambre de tungsteno a  $2100^\circ\text{C}$ . La superficie obtenida es cubierta con resina fotosensible en su totalidad.



**Fig.118** Esquema de montaje de un electrodo de diamante.

Tras esto, y utilizando una máscara, se aplica una descarga de luz UV a 190 nm en los extremos, generando sendas zonas en las que el polímero se ha descompuesto por acción de la radiación UV, dejando descubiertos la superficie del diamante. Ato seguido la muestra es oxidada con plasma de oxígeno durante 5 minutos, para transformar la terminación H de la superficie desprotegida del diamante en grupos carbonilos y éter, en los que posteriormente se depositará, por medio de un vaporador, una capa de oro/titanio que servirá como contacto eléctrico. Realizada la deposición de esta capa, se vuelve a lavar la pieza eliminando todo el polímero con pirrolidona, dejando la superficie del diamante cubierta en sus extremos por las láminas de oro/titanio con un espesor de  $5 \mu\text{m}$  y una anchura de  $0,1\text{mm}$ , permaneciendo el resto de la superficie reducida. Todo el proceso de preparación de un electrodo de diamante se muestra esquemáticamente en la figura 118.

### 5.1.2. Inmovilización del enzima sobre la superficie de diamante.

Para poder inmovilizar una proteína en la superficie del diamante es necesario modificar ésta previamente, incorporando un grupo que pueda ser empleado como punto de unión de moléculas biológicas. En este trabajo se han empleado dos tipos de moléculas orgánicas, que tras su inmovilización a la superficie de diamante, han servido como punto de unión de la enzima a inmovilizar, peroxidasa de *Horse radish*. Se he seleccionado este enzima por presentar características únicas para su empleo dentro de biosensores de 3ª generación. Entre las características más interesantes cabe resaltar la presencia de su grupo hemo catalítico cerca de la superficie. Este factor hace que las distancias existentes entre la superficie del electrodo y centro

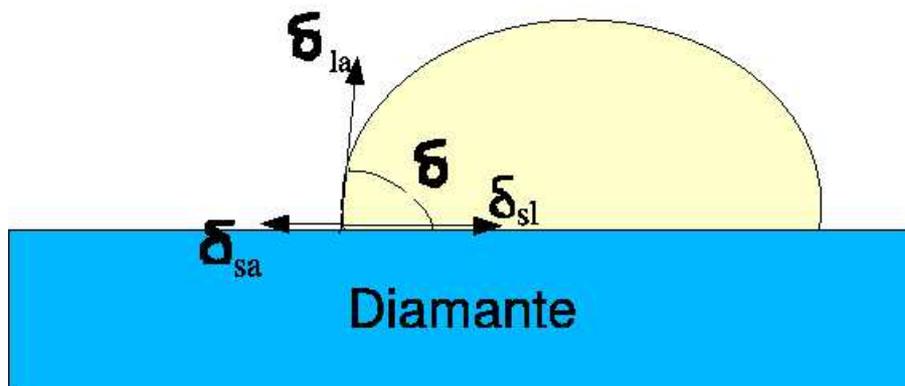
catalítico sean  $\leq 50 \text{ \AA}$  distancia que favorece que tenga lugar el fenómeno "túnel".

### Inmovilización enzimática en superficie de diamante reducida.

Para funcionalizar este tipo de material es necesaria una superficie *H*-terminal homogénea. Para ello el diamante nanocristalino (NCD) es inicialmente oxidado por tratamiento con plasma de oxígeno durante 5 minutos. Este proceso inicial limpia la superficie de la muestra de cualquier tipo de impureza adherida a ella. Después de este proceso la muestra es reducida para obtener los grupos *H*-terminal en su superficie, para ello, se somete a la muestra a un calentamiento a  $700^{\circ}\text{C}$  y un bombardeo con radicales H, como fue explicado anteriormente. Estas muestras *H*-terminal presentan un comportamiento hidrofóbico que ha podido ser evaluado mediante la técnica del ángulo de contacto. El ángulo de contacto está definido por la interfase líquido-superficie-aire. Estos tres vectores de las tensiones superficiales vienen definidos por la ecuación:

$$\cos(\delta) = \frac{\delta_{sa} - \delta_{sl}}{\delta_{la}} \quad (5.1)$$

Donde  $\delta_{sa}$  es la tensión superficial entre la superficie del diamante y el aire,  $\delta_{sl}$  es la tensión superficial entre la superficie del diamante y el líquido y  $\delta_{al}$  es la tensión superficial entre el líquido y el aire.



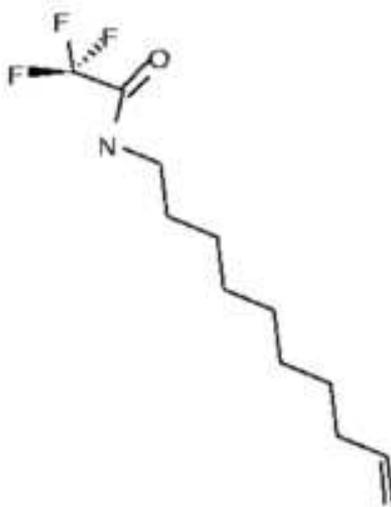
**Fig.119** Esquema de la interfase y ángulo de contacto, donde  $\delta_{sa}$  es la tensión superficial entre la superficie del diamante y el aire,  $\delta_{sl}$  es la tensión superficial entre la superficie del diamante y el líquido y  $\delta_{la}$  es la tensión superficial entre el líquido y el aire.

La figura 120 muestra el ángulo de contacto de una gota de  $1\mu\text{L}$  de agua sobre la superficie de una muestra de NCD reducida. Como se puede observar el ángulo es superior a  $75^{\circ}\text{C}$  lo que indica un claro comportamiento hidrofóbico.



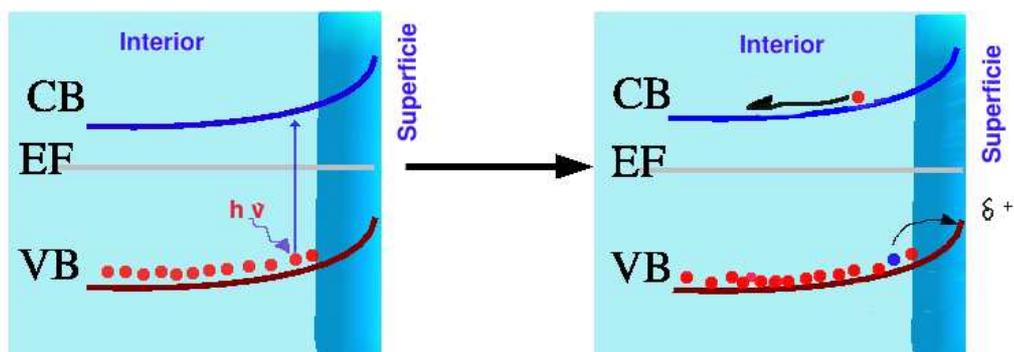
**Fig.120** Ángulo de contacto para una muestra reducida de NCD.

**Unión fotoquímica** Para realizar la funcionalización del NCD *H-terminal* se ha utilizado una amina protegida  $\omega$ -insaturada llamada N 9-decenil 1 trifluoro acetamida (TFA) que se muestra en la figura 121.



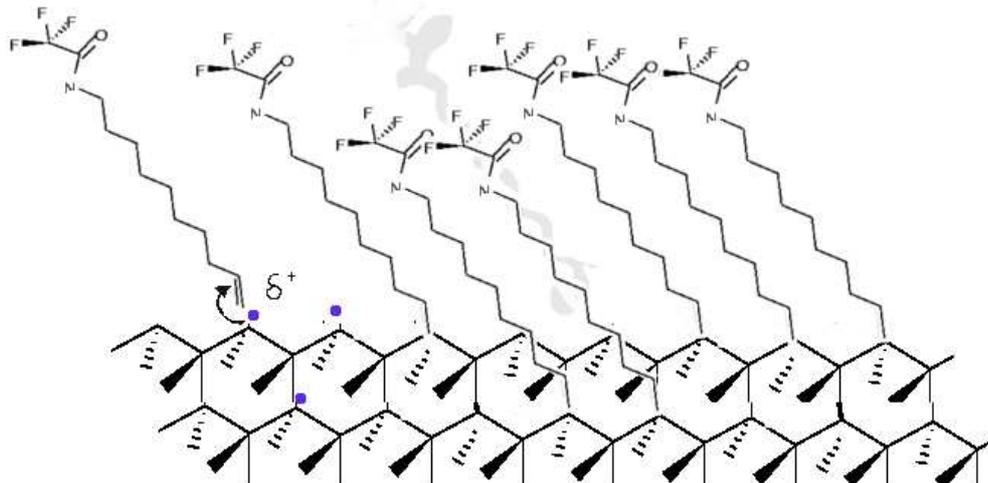
**Fig.121** Estructura química del TFA.

Una pequeña cantidad de esta molécula es depositada en la superficie H terminal del diamante NCD. Una vez terminado este proceso las muestras son iluminadas durante varias horas con luz ultravioleta ( $\lambda = 230nm$ ). La iluminación con luz ultravioleta induce en la muestra de diamante NCD la promoción de los electrones de la banda de valencia de los átomos cercanos a la superficie hacia la banda de conducción. Tras la promoción de los electrones  $\ominus$  estos son llevados hacia el interior de la muestra mientras que los huecos  $\oplus$  se mantienen cerca de la superficie. Esta distribución espacial de la carga genera una densidad de carga positiva  $\delta^+$  en la superficie del diamante favoreciendo de esta forma los ataques nucleofílicos por parte de moléculas ricas en electrones, como el grupo insaturado del TFA.



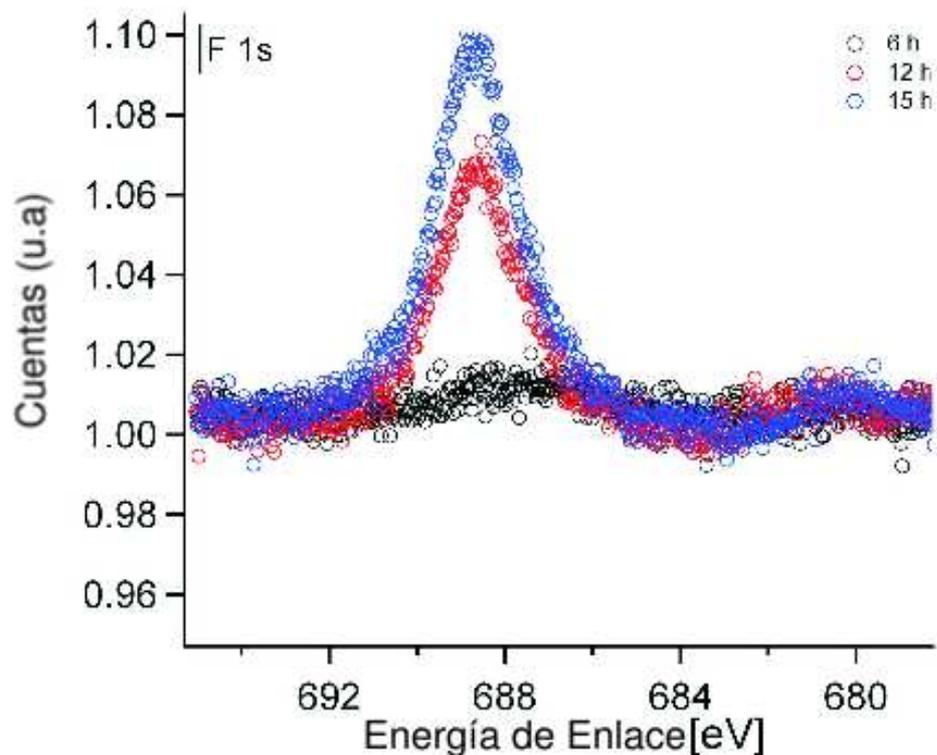
**Fig. 122** Esquema de la promoción electrónica en las bandas de conducción CB, de electrones de la banda de valencia VB y formación de  $\delta^+$

En la figura 122 se muestra esquemáticamente como los electrones promocionan desde la banda de valencia hacia la banda de conducción, formándose  $\delta^+$  en la superficie del diamante, lo que produce el posterior ataque nucleofílico del TFA sobre la superficie del diamante NCD, reacción mostrada en la figura 123.



**Fig. 123** Esquema de la monocapa de TFA inmovilizada covalentemente sobre la superficie de diamante NCD.

Se ha comprobado la eficacia de la inmovilización del TFA en la superficie del NCD, en función de los tiempos de iluminación: 6, 12 y 15 horas. Después de la iluminación, las muestras de diamante son lavadas durante 10 minutos con cloroformo y posteriormente otros 10 minutos con metanol, así se consigue eliminar las moléculas adsorbidas en la superficie. Tras esto las muestras son estudiadas mediante XPS. Utilizando esta técnica se obtiene información semicuantitativa de la abundancia de flúor en la muestra. Como el flúor procede sólo del TFA que se encuentra químicamente unido, su abundancia se puede relacionar con la cantidad de TFA fijado. La figura 124 muestra el registro de abundancia de flúor obtenida mediante XPS.



**Fig. 124** Abundancia relativa de flúor en función del tiempo de iluminación de las muestras.

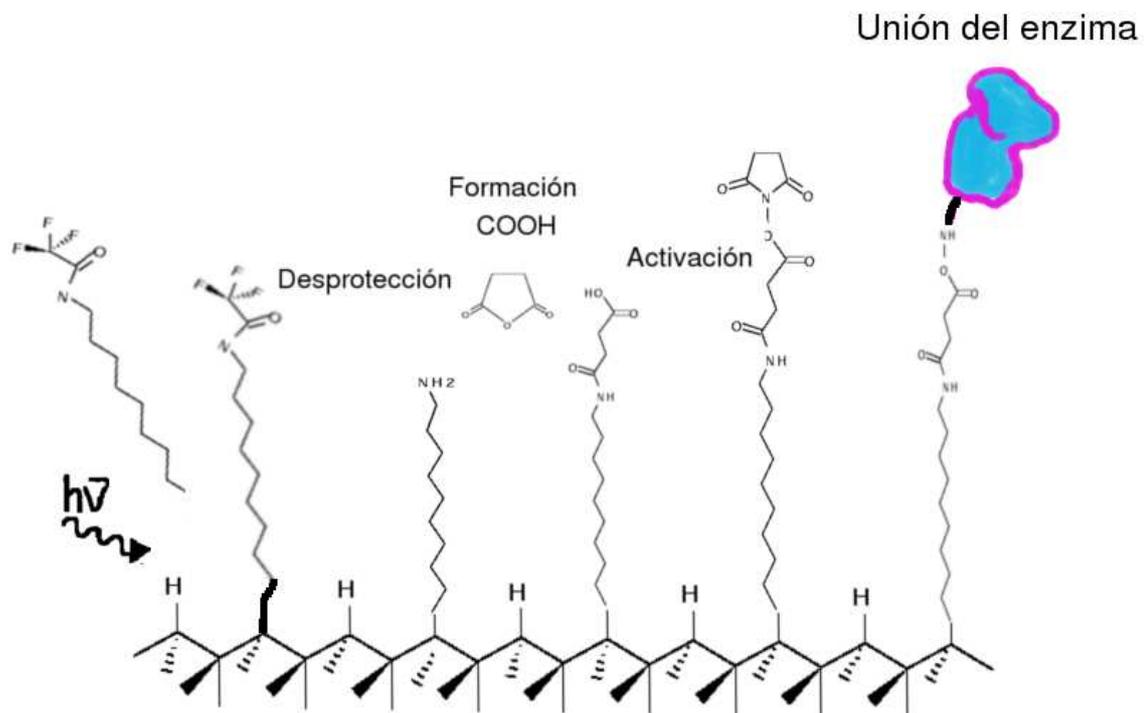
Como se puede observar en la figura anterior a medida que aumentamos el tiempo de exposición aumenta la concentración relativa de flúor en la muestra, lo que indica un aumento en la cantidad de moléculas de TFA químicamente unidas. Debido a estos resultados se ha empleado en todos los procesos tiempos de exposición de 15 horas.

**Desprotección del grupo amina del TFA.** Una vez que el TFA queda inmobilizado en la superficie del diamante se realiza la desprotección del grupo amina. Esta desprotección es llevada a cabo mediante el tratamiento de la muestra de NCD con una disolución de hidróxido de terametilamonio al 25%(w/w) en metanol.

**Transformación del grupo amina en carboxílico.** Realizada la desprotección, se transforma el grupo amina en carboxílico, con el fin de poder unir el enzima a la superficie del diamante utilizando un enlace amida entre ambos. Para transformar el grupo amina en COOH se deposita la muestra de diamante NCD en una solución reguladora de fosfato 50mM a pH 6,2 intentando que esta muestra quede lo más cerca posible de la superficie de la solución. A continuación se añaden, gota a gota, y cada 5 minutos, sobre la muestra de diamante sumergida en la solución reguladora 2,5mL de disolución de anhídrido succínico en acetona (1g/5mL). A medida que se va añadiendo anhídrido succínico el pH de la disolución baja, por lo que se añade NaOH

para mantenerlo en los niveles iniciales. Concluido el proceso de transformación del grupo amina a COOH la muestra de diamante NCD es lavada varias veces utilizando una solución reguladora de PBS a pH 6,2.

**Activación del grupo carboxílico y unión del enzima a la superficie del diamante.** La activación del grupo carboxílico es obtenida mezclando 200 $\mu$ L de una solución 0,4M de 1-etil 3,3-dimetil-amin-carbodiimida (EDC) con 200 $\mu$ L de una solución 0,1M de N-hidroxilsuccinamida (NHS). Con esta mezcla se cubre la superficie del diamante durante 15 minutos, esto activa el grupo carboxílico mediante la formación de un intermedio reactivo con la enzima. Tras este proceso la muestra es lavada repetidamente con agua en abundancia. Finalmente sobre la muestra activada se añade una alícuota de una solución de 2mg/mL de enzima, manteniéndose en contacto durante 12 horas a 4°C. Finalizado este paso se lava la muestra con agua en abundancia y se saturan los posibles sitios activados utilizando una solución 1M de etanolamina, volviéndose a lavar con agua en abundancia. La figura 125 muestra el esquema general de todas las reacciones.

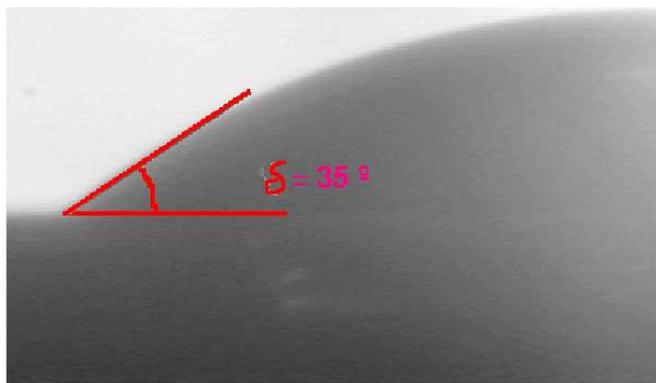


**Fig. 125** Esquema de los pasos realizados para la inmovilización de la enzima en la superficie reducida de diamante NCD.

### Inmovilización enzimática en superficie de diamante oxidado.

Para inmovilizar un enzima sobre una superficie perfectamente oxidada se ha sometido la superficie de diamante NCD a la acción de un plasma de oxígeno durante un período de 5 minutos. Este proceso limpia la superficie de posibles impurezas adheridas a la misma al tiempo que genera grupos carbonilo y éter. Como resultado

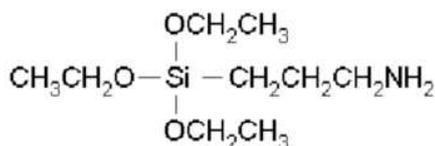
de la oxidación, la superficie del diamante se vuelve hidrofílica lo cual se puede observar al medir el ángulo de contacto. Para ello se deposita una gota de agua de  $1\mu\text{L}$  sobre su superficie, tal y como se muestra en la figura 126.



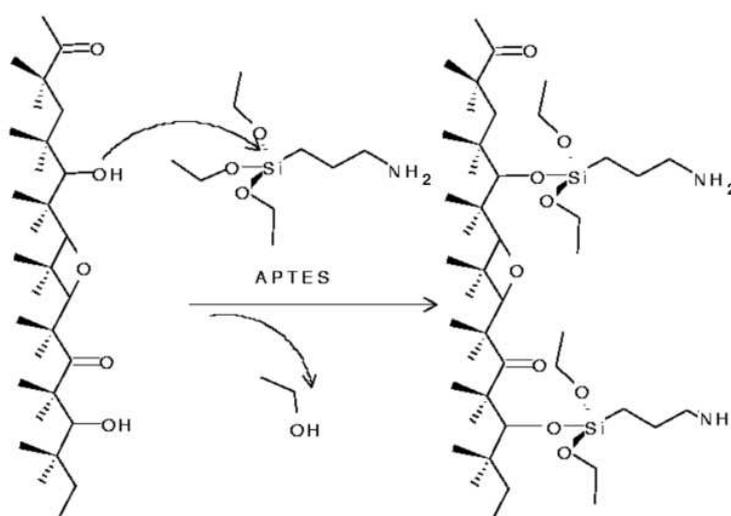
**Fig. 126** Ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie de diamante oxidado.

El ángulo de contacto de la gota no supera los  $35^\circ$ , dato que indica la hidrofilia de la superficie debido a la presencia de grupos carbonilo y éter fundamentalmente.

**Unión química.** Una vez la superficie ha sido oxidada, ésta es tratada con una molécula llamada aminopropiltriétoxissilano (APTES), cuya estructura se muestra en la figura 127.



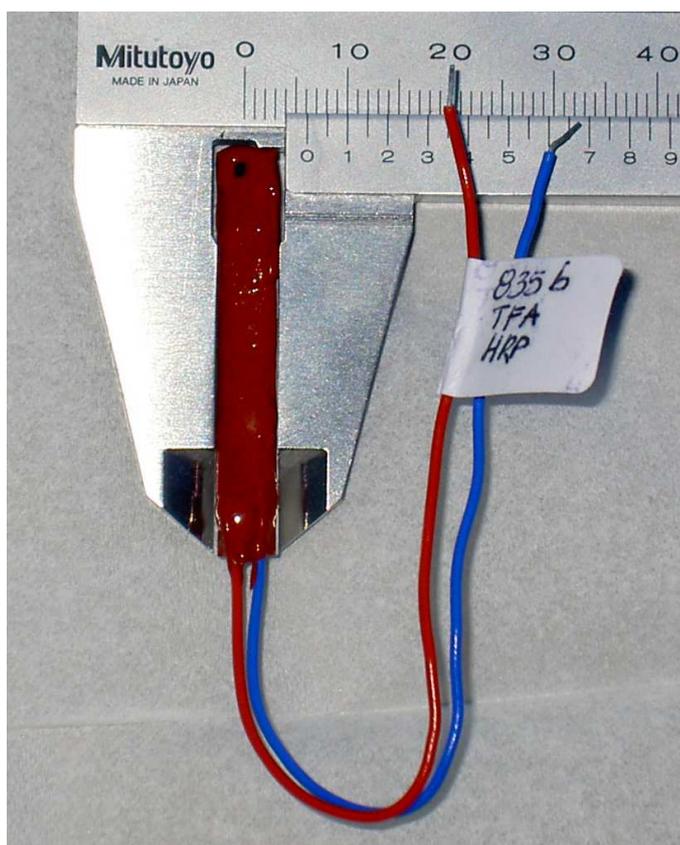
**Fig.127** Estructura del aminopropiltriétoxissilano (APTES).



**Fig.128** Reacción entre la superficie oxidada del diamante y el APTES.

El APTES reacciona con los grupos carbonilo del diamante uniéndose covalentemente a la superficie por medio de enlaces silicato, dando como resultado una capa alifática con un grupo terminal  $-NH_2$ . La unión del APTES a la superficie se realiza por inmersión de la muestra de diamante durante 30 minutos en una solución con APTES. La figura 128 muestra esquemáticamente la reacción en la superficie del diamante oxidado. Los ataques de los grupos OH del diamante hacia el enlace Si-O de la molécula de APTES da lugar a la formación de enlaces silicato entre el diamante y el APTES, liberando en la reacción una molécula de etanol.

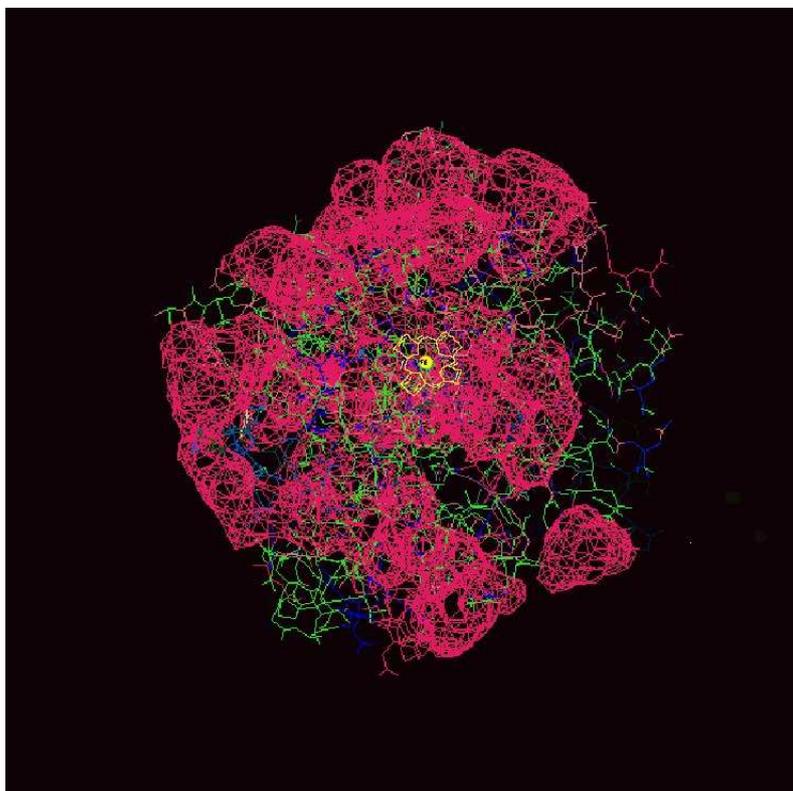
**Transformación del grupo amina en carboxílico.** La transformación del grupo amina a carboxílico, así como la activación y posterior unión del enzima, se realiza utilizando los pasos descritos en las subsecciones anteriores. Una vez realizada la transformación e inmovilización enzimática, las piezas de diamante son montadas sobre una placa de cerámica en la que se han puesto previamente varios contactos. Finalmente el biosensor es sellado utilizando silicona aislante, manteniendo un hueco de  $1mm^2$  en el centro del electrodo, que pone en contacto la superficie del diamante sobre la que se ha inmovilizado el enzima con el medio externo, tal y como se ve en la figura 129.



**Fig. 129** Foto de un biosensor una vez montado sobre la placa de cerámica y cubierto con la silicona aislante.

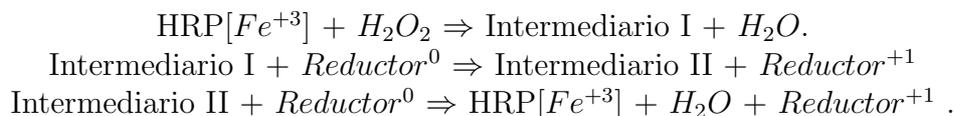
### 5.1.3. Desarrollo de biosensores de 3<sup>a</sup> generación.

En este trabajo se han preparado biosensores de 3<sup>o</sup> generación sensibles a peróxido de hidrógeno, en los que se ha utilizado la *Horse radish* peroxidasa (HRP) como material biológico. Este enzima, que pertenece a la familia de las enzimas oxidoreductoras, tiene un grupo hemo como centro catalítico. La figura 130 muestra la estructura de este enzima.



**Fig. 130** Estructura química de la HRP.

Esta enzima cataliza la oxidación del  $H_2O_2$  a través del mecanismo mostrado a continuación.

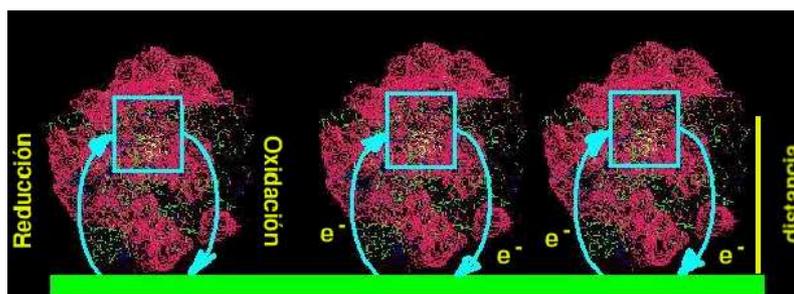


Resultado de la reacción del  $H_2O_2$  con el enzima se genera como producto  $H_2O$  y un compuesto denominado Intermediario I, que es la forma más oxidada del centro activo. Este intermediario I está caracterizado por presentar en su interior el oxiferril hemo ( $Fe^{+IV} = O$ ) y un radical  $\pi$  porfirina. El Intermediario I es catalíticamente activo pudiendo aceptar electrones de un compuesto reductor, que en el caso del biosensor es la superficie del electrodo. Cedido el electrón, el grupo oxiferril hemo es reducido generando el Intermediario II, el cual tras otra reacción de reducción llega a regenerar el grupo hemo ( $Fe^{+III}$ ) característico de la enzima, liberando en la última etapa otra molécula de  $H_2O$  [150].

La regeneración del grupo hemo catalítico, a través del aporte de electrones por parte del electrodo, no sólo ocurre en la HRP sino también en otras enzimas como el Citocromo  $P_{450}$  o las Catalasas, las cuales tienen dos características, tener al menos un grupo hemo en su estructura y mantener distancias entre el grupo hemo y la superficie del enzima no superior a  $20\text{\AA}$  [117, 132, 120]. Todas estas enzimas tienen como peculiaridad mediar en la transferencia directa de electrones desde la superficie de electrodos hasta el centro activo mediante "efecto túnel". Este fenómeno relaciona la probabilidad de tránsito de electrones desde un punto A hasta un punto B, dicha probabilidad depende de una constante cinética de transferencia electrónica  $K_t$ :

$$K_t = A \times e^{-d/\nu} \quad (5.2)$$

Donde A es un factor de frecuencia, d es la distancia que separa el centro del activo del enzima del electrodo y  $\nu$  es un parámetro cuyo valor depende de la anchura de la ventana por la que se puede realizar la transferencia electrónica. Como se puede observar en este modelo, y en otros similares descritos por Li y Kuznetsov [133, 134] existe una dependencia exponencial entre la anchura de la barrera y la  $K_t$  de tal forma que a medida que aumenta la distancia que separa ambos puntos es más difícil que tenga lugar el fenómeno túnel. La figura 131 muestra un esquema de la transferencia electrónica en un electrodo con HRP inmovilizada en su superficie.



**Fig. 131** Esquema de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del diamante.

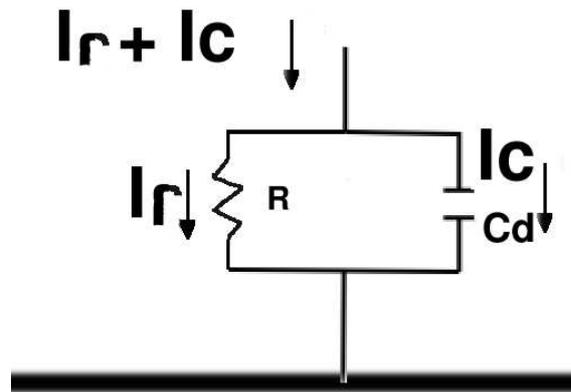
Las simulaciones realizadas empleando estos modelos, han dado como resultado que las transferencias electrónicas pueden realizarse hasta distancias de  $30\text{\AA}$  [134], que por otra parte se corresponden con las distancias del radio medio de enzimas como las anteriormente descritas. El entender el fenómeno de la transferencia electrónica, abre las puertas al desarrollo de un nuevo modelo de biosensores en los que no existe un intermediario, ya sea  $H_2O_2$  o PPy, que transporte los electrones de la reacción enzimática, lo que favorece la alta selectividad de estos biosensores.

#### 5.1.4. Caracterización de los biosensores de 3ª generación.

La caracterización electroquímica de los biosensores anteriormente preparados ha sido realizada mediante el empleo de diferentes técnicas electroquímicas como la espectroscopia de impedancia, voltamperometría cíclica y amperometría. Estas técnicas permiten estudiar tanto la estructura del biosensor como los procesos de transferencia electrónica directa.

## Espectroscopia de impedancia de los electrodos NCD.

Los sistemas electroquímicos pueden ser estudiados con métodos basados en medidas de impedancia. Este método se basa en la medida de una corriente generada al aplicar un potencial alterno, lo que produce pequeñas perturbaciones en el comportamiento de la capa de Helmholtz [135]. El comportamiento electroquímico de esta capa puede asemejarse a un circuito eléctrico formado por una resistencia y una capacidad en paralelo, como la mostrada en la figura 132.



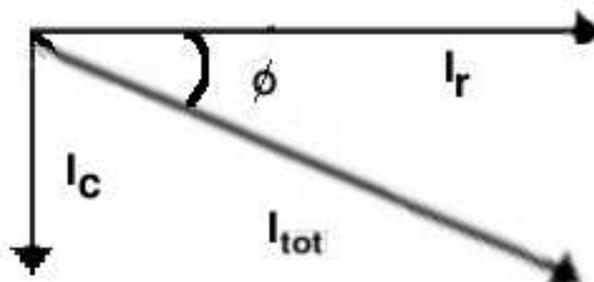
**Fig.132** Circuito equivalente de una celda electroquímica para un electrodo simple  $R$  es la resistencia de los procesos electródicos y  $C_d$  es la capacidad de la doble capa.

La intensidad total medida en la celda va a ser la suma de dos componentes, uno de los cuales está relacionado con la resistencia  $I_r$ , mientras que el otro está relacionado con la capacidad  $I_c$ . Así pues se define  $I_{tot}$

$$I_{tot} = \frac{V_0}{R} \text{sen}(\omega t) + \frac{V_0}{X_c} \text{sen}(\omega t + \frac{\pi}{2}) \quad (5.3)$$

Siendo  $\omega = 2\pi f$ , donde  $f$  es la frecuencia de la fuente en H y  $X_c$  es la reactancia capacitiva.

Además la  $I_{tot}$  puede considerarse como una suma vectorial de la intensidad  $I_c$  e  $I_r$ , tal y como se muestra en la figura 133.



**Fig.133** Suma vectorial de las intensidades de la celda.

Que puede expresarse en términos matemáticos como:

$$|I_{tot}| = (I_r^2 + I_c^2)^{1/2} \quad (5.4)$$

$$|I_{tot}| = V \left( \frac{1}{R^2} + \frac{1}{X_c^2} \right)^{1/2} \quad (5.5)$$

Siendo por lo tanto la impedancia:

$$|Z| = \left( \frac{1}{R^2} + \frac{1}{X_c^2} \right)^{1/2} \quad (5.6)$$

Estando definida la fase del ángulo:

$$\rho = \arctan \frac{I_c}{I_r} = \arctan \frac{1}{\omega RC} \quad (5.7)$$

A partir de aquí se deduce:

$$\mathbf{Z} = R - \frac{i}{\omega C} \quad (5.8)$$

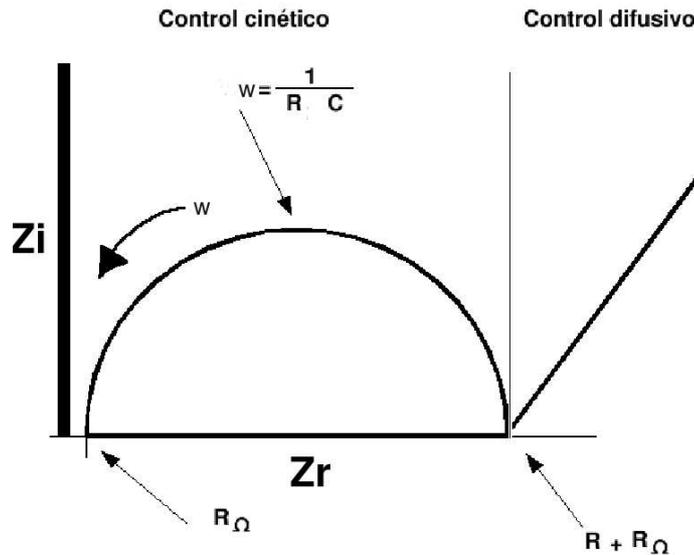
Generalmente cuando se trabaja en celdas electroquímicas aparece una nueva resistencia denominada  $R_\Omega$ , que procede de la resistencia que la solución ofrece al paso de la corriente. Esta nueva resistencia suele sumarse en serie a la componente real de la impedancia. Teniendo en cuenta esto, la impedancia de un circuito formado por una celda electroquímica queda definida por.

$$Z = R_\Omega - i \frac{R}{\omega RC - i} \quad (5.9)$$

De Donde fácilmente se puede separar  $Z$  en la parte imaginaria y la real.

$$Z_r = R_\Omega + \frac{R}{1 + (\omega RC)^2} \quad Z_i = \frac{R^2 C \omega}{1 + (\omega RC)^2} \quad (5.10)$$

El significado de estas ecuaciones implica la variación de la impedancia en función de la frecuencia. De esta variación es posible extraer fácilmente  $R_\Omega$ ,  $C$  o  $R$  utilizando la representación de Nyquist, que muestra  $Z_i$  frente a  $Z_r$  tal como se puede ver en la figura 134.

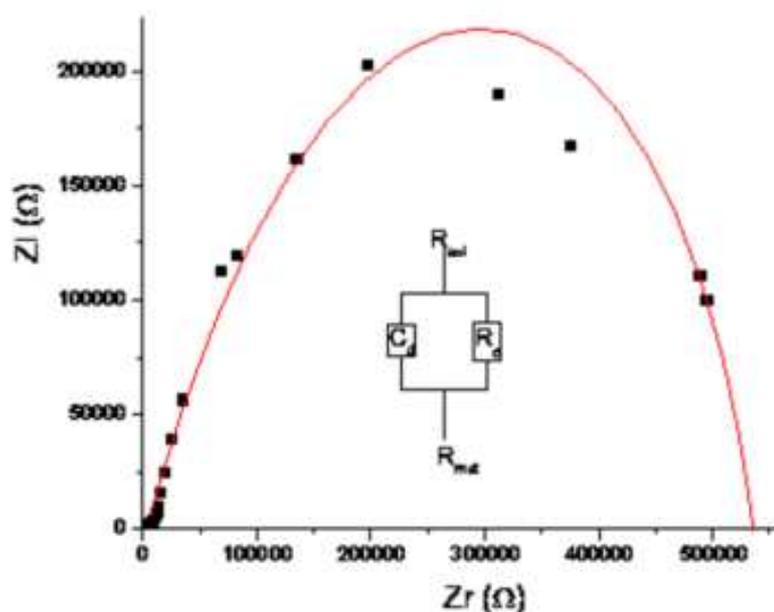


**Fig.134** Representación de Nyquist de las impedancias componentes del electrodo.

Esta representación define el valor de cada uno de los elementos de la celda y sirve como soporte en el que ajustar de las simulaciones correspondiente a los circuitos equivalentes propuestos.

En este trabajo se han realizado medidas de impedancia en las que se compara la contribución de diferentes factores, como son la composición del material electrodo utilizado, la interacción entre el electrodo y el medio, así como la existencia o no de moléculas inmovilizadas en la superficie. Con el fin de poder identificar la contribución de cada uno de los elementos que intervienen en la impedancia de un electrodo, ésta ha sido medida durante las etapas de preparación del electrodo. Además para poder comparar las medidas de impedancia se ha empleado una celda electroquímica especialmente diseñada. Esta celda mantiene una distancia muy pequeña y constante entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, manteniendo el electrodo auxiliar lo más alejado posible del de trabajo, con el fin de garantizar que la corriente de fondo sea lo mas baja posible y garantizar unas condiciones óptimas de medida.

**Espectroscopia de impedancia en electrodos de diamante reducidos.** En la figura 135 se muestra el diagrama de Nyquist de un electrodo reducido no modificado.



**Fig. 135** Representación de Nyquist de un electrodo de diamante no modificado.

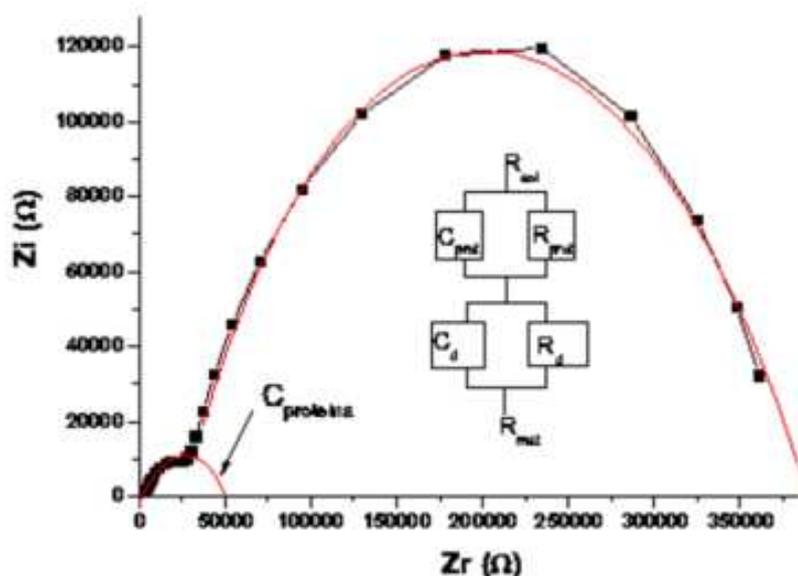
Del ajuste de la curva, utilizando el circuito equivalente insertado en la figura anterior, se obtiene que la resistencia del material es de  $9,840 \Omega / cm^2$ , además este circuito presenta una capacidad que tiene una resistencia interna de  $1,6 \times 10^7 \Omega / cm^2$  y una capacidad de  $C_d = 72 \mu F / cm^2$ . Teniendo en cuenta que la capacidad está relacionada con la constante dieléctrica  $\epsilon_r$  según la ecuación 7.11:

$$C_d \propto \frac{\epsilon_r}{d} \quad (5.11)$$

$$\epsilon_r = \epsilon_o \times K \quad (5.12)$$

Donde  $C_d$  es capacidad del circuito equivalente a la capacidad de la doble capa,  $\epsilon_r$  constante dieléctrica del medio,  $\epsilon_o$  es la constante dieléctrica en vacío e igual a  $8,854 \times 10^{-12} F/m$  y  $K$  es el valor de la constante dieléctrica del agua a  $25^\circ C$  e igual a 78,54. Con estos datos se puede calcular la anchura de la capa de iones que se encuentra adyacente a la interfase obteniéndose un el valor  $9,4 \text{ \AA}$ .

En el caso del electrodo con TFA inmovilizado, la capa orgánica depositada en la interfase produce una bajada en la constante dieléctrica, dando como resultado capacidades menores,  $C_d = 6,6 \mu F/cm^2$ . Si se determina el espesor en este caso, utilizando una  $K = 8,1$ , se obtiene que el espesor de la doble capa se mantiene del orden de  $10,72 \text{ \AA}$ . Es decir, a priori no existe ninguna variación en la distancia de la doble capa al introducir la monocapa de TFA. Sin embargo cuando se fija la enzima HRP, tal y como se puede observar en la figura 136, el diagrama de Nyquist se ve claramente modificado.



**Fig. 136** Representación de Nyquist del electrodo con HRP inmovilizada covalentemente. En esta figura se muestra también el circuito eléctrico equivalente utilizado en el ajuste de los resultados experimentales.

Como se puede ver en la figura existen dos semicírculos, resultado de la contribución del enzima y de la doble capa de iones. Del ajuste del circuito se obtiene que la capacidad de la proteína es  $C_{prot} = 2,2 \mu F/cm^2$ , este descenso puede relacionarse con una distancia de  $\sim 50 \text{ \AA}$ , cuando se asigna un valor de  $\sim 15$  a  $K$ . Este resultado implicaría un aumento en el espesor de la interfase. Efectos similares se han observado también en los electrodos de diamante oxidado en Donde aparece un incremento semejante de la distancia de la doble capa, con la peculiaridad de que en este tipo de electrodos, cuando son modificados con APTES, las impedancias son menores y en consecuencia las distancias de la interfase mayores. Se piensa que este fenómeno se debe a la tendencia del APTES a reaccionar entre sí, generando como consecuencia una capa orgánica no homogénea, superior en tamaño a las láminas preparadas con

TFA. Las tablas 16 y 17 muestran los resultados de impedancias de las diferentes muestras analizadas.

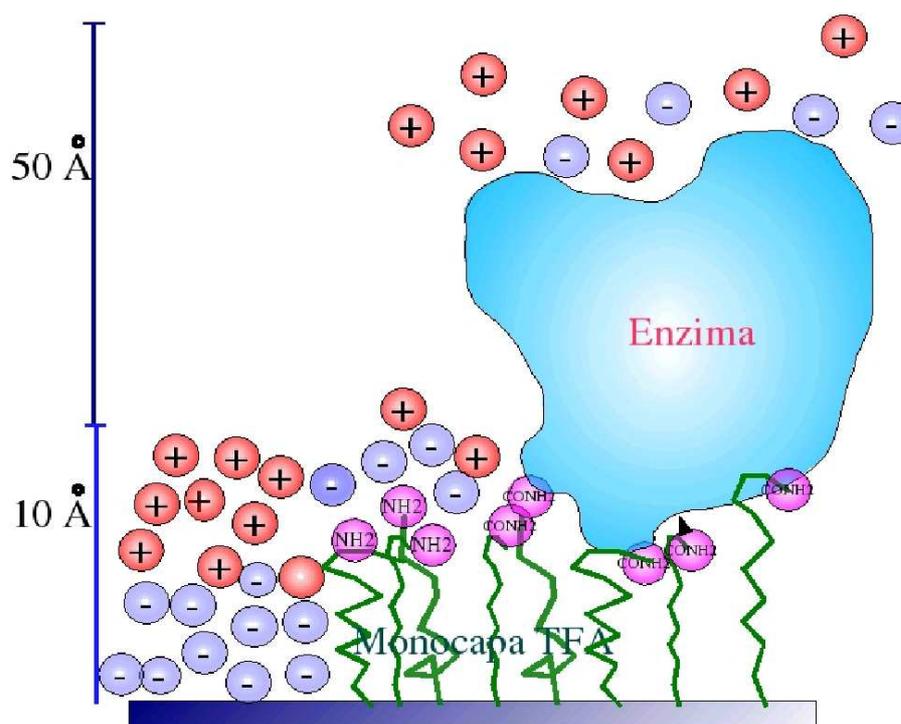
**Tabla 16** Resultados de impedancia de electrodo de diamante *NCD* reducido.

	$NCD_{red}$	$NCD_{red} - NH_2$	$NCD_{red} - HRP$
$K$	78,54	8,1	15
$C(F/cm^2)$	$7,5 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$
distancia ( $\text{\AA}$ )	8,8	10,8	60

**Tabla 17** Resultados de impedancia de electrodo de diamante *NCD* oxidados.

	$NCD_{oxd}$	$NCD_{oxd} - NH_2$	$NCD_{oxd} - HRP$
$K$	78,5	8,1	15
$C(F/cm^2)$	$1,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
distancia ( $\text{\AA}$ )	6,6	2	88,5

Con los resultados obtenidos, se puede deducir que la estructura de la interfase del electrodo está configurada tal y como se muestra en el modelo de la figura 137.

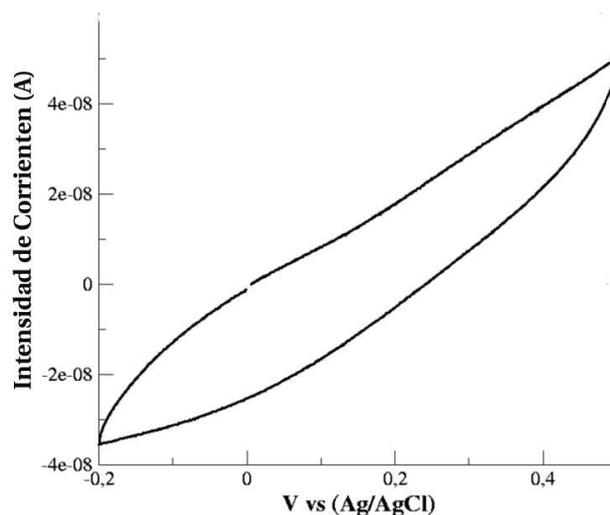


**Fig. 137** Representación de la doble capa de iones formada en un electrodo de diamante: a) sin TFA inmovilizada, b) con monocapa de TFA inmovilizado c) con una monocapa de HRP inmovilizada.

Como se aprecia en el modelo, a medida que se introducen capas orgánicas se produciría un aumento en la doble capa, haciendo que esta fuera máxima en el caso del electrodo con el enzima inmovilizado.

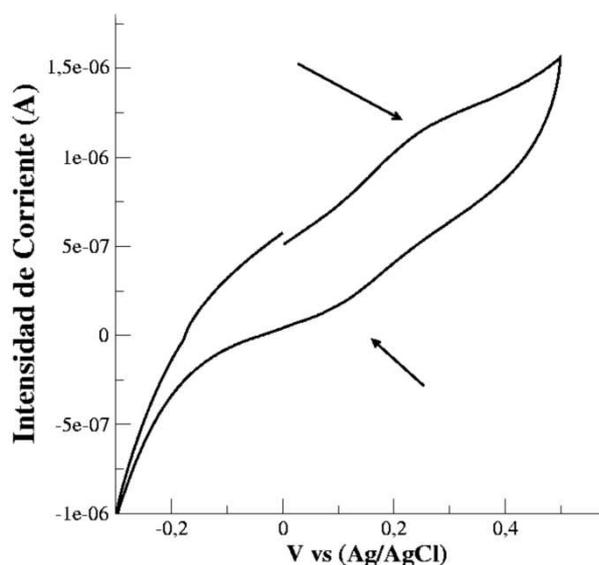
## Caracterización de los electrodos mediante voltamperometría cíclica

La caracterización de los electrodos de diamante ha sido completada mediante voltamperometría cíclica. Esta técnica se utiliza para el estudio de las propiedades de sistemas en los que no intervienen procesos difusivos, como es la transferencia electrónica entre el enzima y la superficie de un electrodo [117, 152, 150]. La figura 138 muestra el registro obtenido en un electrodo reducido no modificado.



**Fig. 138** Voltamperometría cíclica del electrodo de diamante hidrogenado no modificado. Condiciones de medida: solución reguladora PBS pH 6,2, velocidad de barrido 20mV/s

Este tipo de electrodo, tomado como referencia, carece de procesos rédox asociados. Otra cualidad del diamante que cabe destacar es la baja corriente de fondo, lo cual será sumamente útil en las medidas de transferencia electrónica.

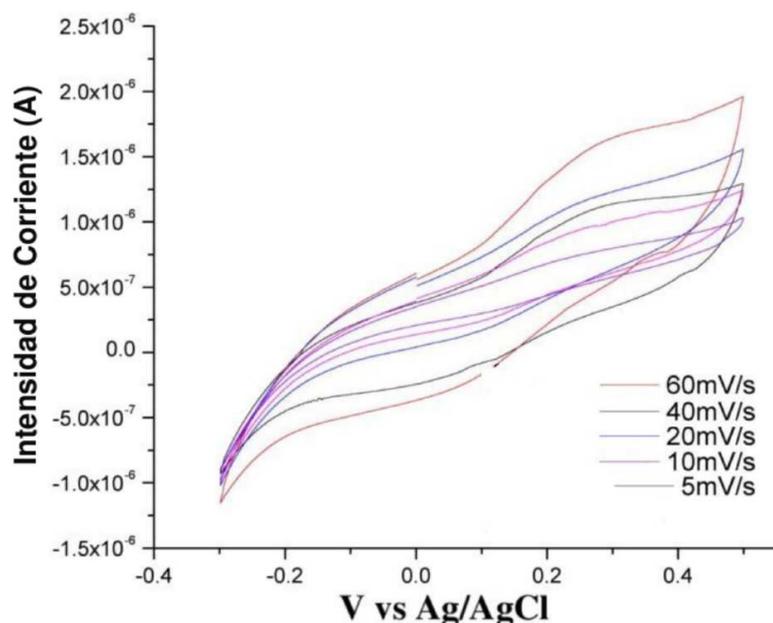


**Fig. 139** Voltamperometría cíclica del electrodo de diamante hidrogenado modificado.

En la figura 139 se muestra el registro de un electrodo de diamante hidrogenado modificado con HRP. Como se puede observar en la figura anterior existen dos ondas rédox claramente definidas en 0,1V y 0,3V vs. Ag/AgCl. Estas ondas rédox han sido relacionadas por otros autores con el estado de carga de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$  del grupo hemo del enzima inmovilizado [149]. Integrando el área bajo la curva del proceso catódico se puede obtener que la carga total de la reacción es igual a  $1,02 \times 10^{-6}C$ . Esta carga se relaciona con el promedio de la superficie cubierta a través de la expresión:

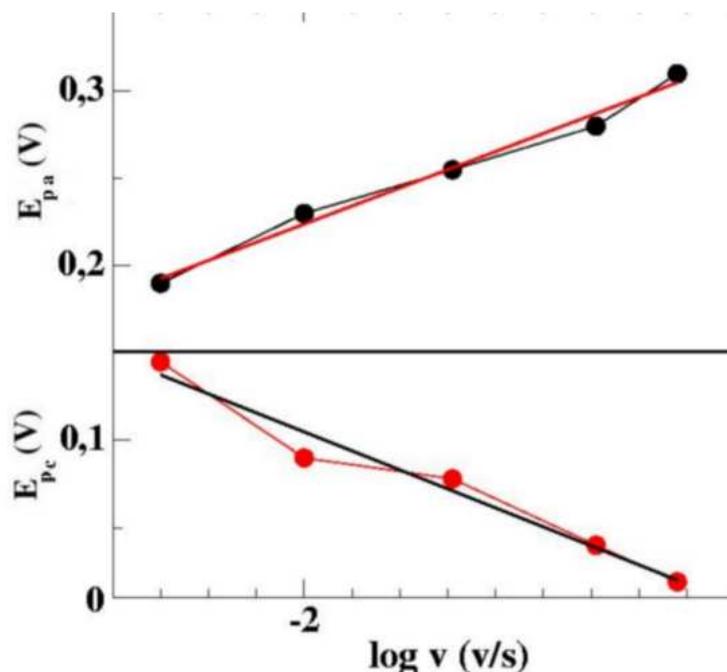
$$Q = nFA\Gamma \quad (5.13)$$

Donde Q es la carga que participa en el proceso, n es el número de electrones que intervienen, F la constante de Faraday, A es el área del electrodo y  $\Gamma$  es el promedio de superficie cubierta en  $(mol/cm^2)$ . Se determina que el promedio de superficie cubierta por la enzima ( $\Gamma$ ) es igual a  $1,1 \times 10^{-9}mol/cm^2$ . Con el objetivo de calcular la constante de transferencia electrónica que existe en este proceso rédox se han realizado ciclo-voltamperometrías a diferentes velocidades de barrido en los electrodos modificados tal y como se muestra en la figura 140.



**Fig. 140** Voltamperometría cíclica del electrodo de diamante hidrogenado modificado.

Como se puede apreciar, a medida que aumenta la velocidad de barrido, las ondas correspondientes a los procesos de oxidación y de reducción se van alejando cada vez más hacia potenciales más positivos en el caso de los procesos de oxidación y hacia más negativo en el de los procesos de reducción. Cuando la variación del potencial entre el pico anódico ( $E_{pa}$ ) y catódico ( $E_{pc}$ ) es superior a  $200mV/n$ , existe una relación lineal entre el potencial de los picos anódicos y catódicos en función de la velocidad de barrido tal y como se muestra en la figura 141.



**Fig. 141** Variación de los picos de oxidación y reducción en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

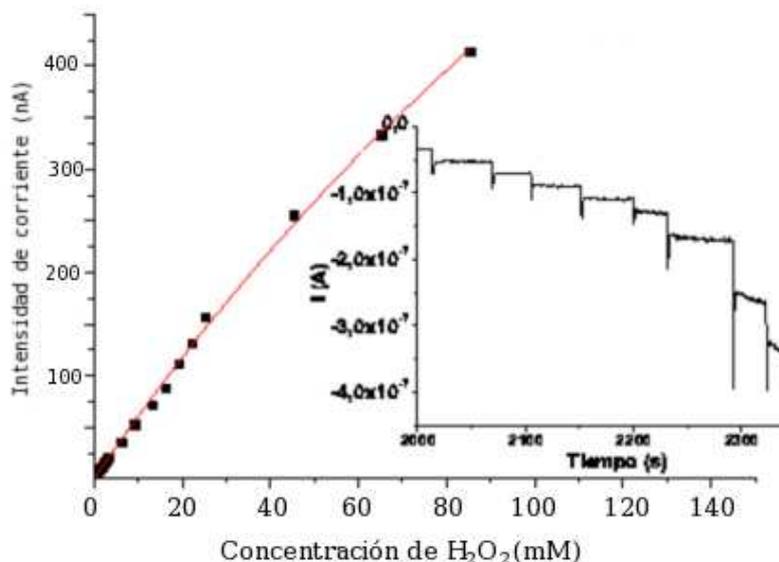
La pendiente obtenida se corresponde con  $-2,3RT/\alpha nF$  en el proceso catódico y con  $2,3RT/(1-\alpha)nF$  en el proceso anódico [121, 147]. Donde  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura,  $n$  es el número de electrones del proceso,  $F$  es la constante de Faraday y  $\alpha$  es la constante de proporcionalidad del proceso, la cual está relacionada con la constante de transferencia electrónica. A partir de las pendientes se ha calculado que  $\alpha$  es igual a 0,49. La constante electrónica de transferencia  $K_c$  está relacionada con  $\alpha$  mediante la siguiente expresión

$$\log(K_c) = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log(\alpha) - \log\left(\frac{RT}{nF\nu}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2,3RT} \quad (5.14)$$

Donde  $K_c$  es la constante de transferencia electrónica,  $\Delta E_p$  es la variación de potencial a una velocidad de barrido dada y  $\nu$  es la velocidad de barrido. Utilizando la expresión anterior se ha calculado que la  $K_c$  del proceso es igual a  $0,066 \text{ s}^{-1}$ . Valores similares son obtenidos cuando se emplean moléculas alifáticas como puntos de inmovilización de enzimas en electrodos. La barrera producida por esta monocapa incrementa la resistencia al paso de los electrones produciéndose un descenso de  $K_c$  [63].

### Aplicación de los biosensores

En este trabajo se ha determinado la concentración de peróxido de hidrógeno, utilizando para ello uno de los biosensores anteriormente propuestos midiendo a  $0,05\text{V vs. Ag/AgCl}$ . La figura 142 muestra el resultado de dicha experiencia.

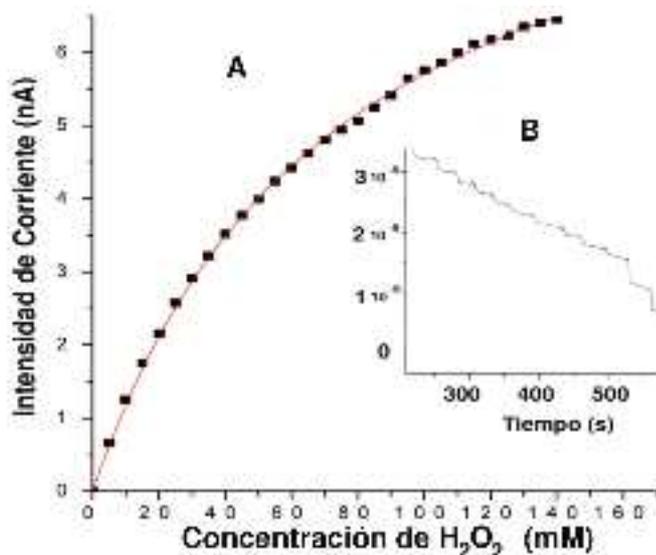


**Fig. 142** Curva de respuesta del biosensor de diamante reducido en función de la concentración de  $H_2O_2$ .

Como se puede observar, el biosensor propuesto mantiene la linealidad en el rango comprendido entre 0,1 hasta 45 mM de peróxido de hidrógeno con un coeficiente de correlación de 0,996 y una ecuación:

$$y_{nA} = 0,8_{nA} + 5,3_{nA/mM} \times x_{mM} \quad (5.15)$$

El límite de detección se ha establecido en 0,1mM teniendo en cuenta S/R=3. En el caso de los biosensores preparados con diamante oxidado y APTES, la curva de calibración obtenida al medir la concentración de  $H_2O_2$  a +0,05V vs Ag/AgCl, se muestra en la figura 143.



**Fig. 143** Curva de respuesta del biosensor de diamante oxidado en función de la concentración de  $H_2O_2$ . B) Respuesta del biosensor a la adición de  $H_2O_2$  en función del tiempo.

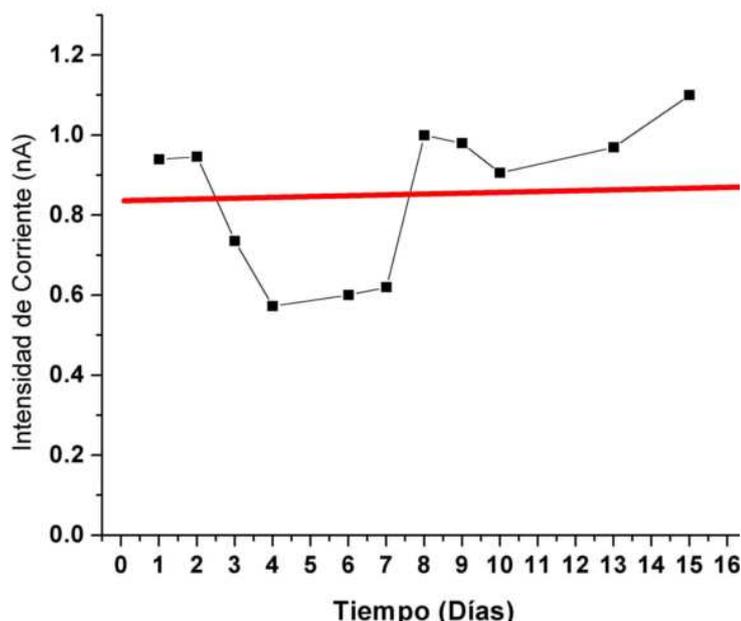
En esta curva el límite de detección del biosensor resultante está entre 1mM y 45mM, con un coeficiente de correlación de 0,992 y una ecuación:

$$y_{nA} = 0,22_{nA} + 0,09_{nA/mM} \times x_{mM} \quad (5.16)$$

Al igual que en el caso anterior el límite de detección se determina mediante  $S/R=3$ . Como se puede observar comparando los resultados, el biosensor preparado con diamante oxidado presenta una sensibilidad menor que el biosensor preparado con diamante reducido. Esto puede ser debido a la tendencia del APTES a "polimerizar" en la superficie del diamante, generando una capa orgánica de mayor espesor que afecta a la transferencia electrónica de forma exponencial, tal y como se vio en la ecuación 7.2. Como consecuencia disminuye la eficacia de la transferencia electrónica desde el enzima al electrodo. En el recuadro de la figura 142 se observa como el biosensor responde en unos pocos segundos la adición de  $H_2O_2$ .

### 5.1.5. Estabilidad

Se ha evaluado la estabilidad del biosensor preparado con diamante oxidado en función del tiempo. Para esto se ha mantenido el biosensor en solución reguladora PBS pH 6,2 a temperatura ambiente durante todo el tiempo que duró el experimento. La figura 144 muestra los resultados de estabilidad de uno de los biosensor preparado con diamante oxidado.



**Fig. 144** Estabilidad del biosensor de diamante nanocristalino oxidado en función del tiempo.

El biosensor preparado con diamante oxidado fue capaz de trabajar durante un período de 15 días tal y como se muestra en la figura 144. El biosensor preparado con diamante reducido mantuvo una estabilidad similar.

## Capítulo 6

# Estudio de la dinámica molecular en microgeles de poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAM, para su posible aplicación en biosensores

### 6.1. Movimientos moleculares en microgeles de PNIPAM

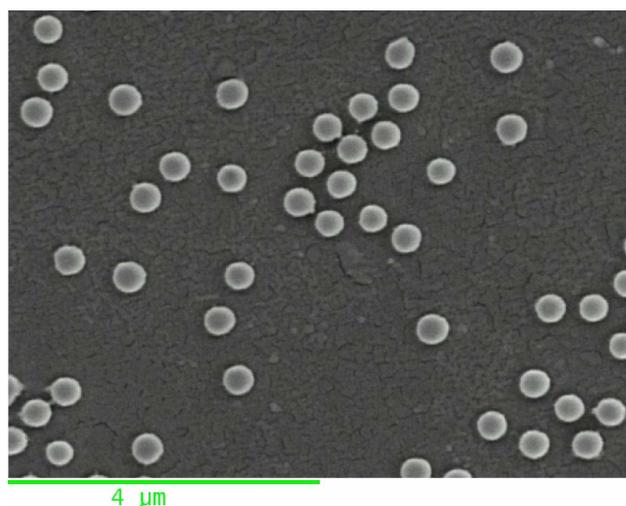
Nos planteamos completar los estudios estructurales en geles con estudios de dinámica molecular utilizando dispersión elástica y cuasielástica de neutrones. Seleccionamos como sistema de trabajo microgeles de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) por presentar una transición de volumen muy acentuada a la temperatura de 33,6°C que permite poner de manifiesto cambios en los movimientos moleculares de la cadena del polímero. Además, los microgeles poliméricos constituyen un grupo interesante por sus prometedoras aplicaciones en nanotecnología, ya que a diferencia de los macrogeles pueden responder rápidamente a estímulos externos. Los microgeles de PNIPAM presentan una transición reversible en su volumen desde un estado hinchado a otro colapsado [154, 155] que tiene características de una transición de fase (TFV). Esta transición es el resultado de la competición entre fuerzas intermoleculares repulsivas y fuerzas atractivas provenientes de los entrecruzamientos y los puentes de hidrógeno. La fuerza directora del hinchamiento de los geles es la energía de mezcla ( $\Delta G_m$ ) del polímero y el solvente, dada por la teoría de Flory-Huggings. Esta fuerza llevaría a la disolución del polímero si este no tuviera una componente elástica, debido al entrecruzamiento de las cadenas, que la compensa y limita su expansión [72]. Las propiedades de los geles hinchados han sido estudiadas y se conoce que la fracción de volumen de red polimérica en condiciones de equilibrio de hinchamiento se describe bien con la teoría de Flory-Rehner [94].

La estructura de los microgeles de PNIPAM y los cambios que experimenta durante la TFV ha sido investigada utilizando dispersión de neutrones a bajo ángulo y dispersión dinámica de luz. Para su interpretación se ha propuesto un modelo de microgel con corteza y núcleo, conteniendo este último una mayor concentración de moléculas de entrecruzante. Medidas independientes [156] parecen confirmar este modelo, estimando que el espesor de la corteza es alrededor de 20 nm. Sin embargo la dinámica del fenómeno no ha sido todavía investigada.

En este trabajo presentamos la dinámica molecular en microgeles termosensibles de PNIPAM en los estados hinchado y colapsado. Para el estudio utilizamos un microgel con 0,25 % de entrecruzante que presenta una distribución de tamaño de partícula estrecha y además muestra un brusco cambio en el radio a la temperatura de la TFV. El primer objetivo de este capítulo es investigar la dinámica de la cadena polimérica cuando el gel está en los estados hinchado y colapsado. El segundo objetivo es estudiar como influye la TFV en los movimientos difusivos de las cadenas poliméricas.

### 6.1.1. Preparación de los microgeles

Los microgeles de PNIPAM fueron preparados mediante polimerización radicalaria sin emulgente. Para ello se disolvieron 4g de NIPAM y 10mg de BIS en 300mL de agua destilada. Una vez disueltos los monómeros de los microgeles, se calentó la solución hasta 75°C. Alcanzada esta temperatura se inició la polimerización añadiendo 1,5g de persulfato amónico como iniciador. La polimerización se llevo a cabo en condiciones anaerobias que se aseguraron haciendo burbujear nitrógeno durante las 12 horas que duró la reacción de polimerización. Cuando la reacción terminó, los microgeles se centrifugaron a 4500 r.p.m. durante 30 min a 35°C. Posteriormente se recogieron mediante filtrado y para asegurar la eliminación de cualquier resto de reactivos, se dializaron frente agua miliQ durante una semana. La figura 145 muestra nanopartículas de PNIPAM sintetizadas.



**Fig. 145** Nanopartículas de PNIPAM sintetizadas por polimerización radicalaria sin emulgente.

Finalmente fueron liofilizados y almacenados en cámara fría a 4°C. Las muestras para los experimentos de neutrones se prepararon dispersando los microgeles liofilizados en agua pesada para obtener contraste entre el H de la cadena polimérica y el del solvente. Para disminuir las interacciones coloidales entre las partículas de microgel en la solución y para evitar dispersión múltiple, las disoluciones se prepararon diluidas al (3 %).

### 6.1.2. Caracterización mediante dispersión de neutrones

El estudio de la dinámica molecular se realizó utilizando dispersión elástica y cuasielástica de neutrones. Los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto Laue-Langevin en Grenoble usando el espectrómetro IN 10. Durante la experiencia la resolución en energía fue  $\delta E \sim 2\mu eV$ , lo que permite estudiar dinámicas en el rango de  $10^{-9}$ s. La longitud de onda de los neutrones se fijó en  $\lambda = 6,27\text{\AA}$ . Las medidas se registraron con los siete detectores del instrumento cubriendo el rango  $0,5\text{\AA}^{-1} < Q < 2\text{\AA}^{-1}$ , donde Q es el módulo del momento transferido por el neutrón y esta dado por  $Q = (4\pi/\lambda)\text{sen}(\theta)$ , donde  $2\theta$  es el ángulo de dispersión. La componente elástica de la intensidad dispersada se midió utilizando el llamado método de la "ventana elástica fija". Se define una estrecha ventana de energía (resolución del espectrómetro cuando la transferencia de energía es cero) colocando el monocromador y el analizador a la misma energía y la intensidad integrada dentro de la ventana de energía es la medida de la componente elástica [166]. Las medidas de dispersión cuasielástica se realizaron variando, mediante calentamiento y enfriamiento controlado, el espaciado de red de un cristal de KCl usado como monocromador, el cual proporciona una ventana de energía  $-6\mu eV < E < 16\mu eV$ . Los espectros cuasielásticos se registraron a 290K y 327K en los siete detectores del instrumento. La geometría del portamuestras fue del tipo cilindro hueco con doble pared y sellado para evitar pérdidas de  $D_2O$  por evaporación durante la realización de las medidas. El espesor y concentración de la muestra se seleccionaron de manera que la transmisión fuera del 85% y al mismo tiempo minimizar la dispersión múltiple. La resolución experimental se obtuvo de una medida realizada en la muestra a 100K, temperatura a la que se supone que no existe ningún movimiento molecular. Para asegurar la bondad de la función de resolución, también se registró el espectro de una muestra de vanadio con la misma forma y espesor que la muestra de PNIPAM. Se utilizaron programas estándar del ILL para hacer las correcciones debidas a la dispersión por el portamuestras vacío, normalización de datos y ajuste de los picos cuasielásticos.

### Dispersión incoherente de neutrones en polímeros

De las medidas de dispersión de neutrones se obtiene la doble sección eficaz diferencial  $d^2\sigma/d\Omega dE$  que nos da el número de neutrones dispersados en el elemento de ángulo sólido  $d\Omega$ , con energía comprendida entre E y E+dE. Esta sección eficaz se relaciona con la función de dispersión coherente  $S_{coh}(Q, \omega)$  y con la incoherente

$S_{inc}(Q, \omega)$  a través de las expresión;

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{k_f}{k_i} \left[ \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} S_{coh}(Q, \omega) + \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} S_{in}(Q, \omega) \right] \quad (6.1)$$

donde  $k_i$  y  $k_f$  son los valores absolutos de los vectores de onda de las ondas (neutrones) incidente y dispersada respectivamente y  $\sigma_{coh}$ , y  $\sigma_{inc}$  son la sección eficaz coherente e incoherente respectivamente para el proceso de dispersión neutrón-núcleo. La sección eficaz incoherente del hidrógeno es muy grande en comparación con las secciones eficaces coherente e incoherente de otros átomos en la muestra, como carbón, oxígeno y nitrógeno. Para el PNIPAM el cociente  $\sigma_{inc(H)}/\sigma_{inc(Total)}$  es 0.9997 y por esto de las medidas obtenemos  $S_{inc}(Q, \omega)$  para los átomos de H y de aquí podemos inferir la dinámica del segmento de la cadena polimérica donde se sitúa dicho átomo. La dinámica molecular en sistemas poliméricos resulta de la superposición de movimientos de vibración, rotación y translación. La escala de tiempos para estos movimientos es lo suficientemente distinta para cada uno, de tal manera que en los espectros de IQNS, aspectos característicos de cada uno de estos movimientos aparecen separados en diferentes intervalos de energía ( $\omega$ ). Además, cualquier movimiento rotacional es generalmente muy rápido en la escala temporal de los movimientos traslacionales y forma un fondo muy tenue, que puede separarse en el espectro cuando se usa el espectrómetro de alta resolución como es IN 10. Así, para el análisis de los datos, hemos considerado que los movimientos moleculares están formados por una combinación de un movimiento vibracional armónico y un movimiento traslacional de tipo difusivo. Entonces, se puede escribir,

$$S_{inc}(Q, \omega) = S_{vib}(Q, w) \otimes S_{tran}(Q, w) \quad (6.2)$$

Donde  $\otimes$  es el producto de convolución en  $w$  y los movimientos de vibración aparecen en el factor de Debye-Waller. La aproximación para el estudio de la dinámica polimérica es considerar que la función de dispersión se puede derivar teóricamente en base a modelos simples. Para un sistema que contiene un gran número de modos vibracionales con distribución de frecuencia  $g(w)$ , el factor de estructura dinámico está dado por:

$$S_{vib}(Q, \omega) = e^{(-\langle u^2 \rangle Q^2/3)} \left\{ \delta w + \frac{\eta Q^2}{6m} \frac{q(w)}{w} \left[ n(w) + \frac{1}{2} \pm \frac{1}{2} \right] \right\} \quad (6.3)$$

Donde  $g(-\omega)=g(\omega)$  y el signo + se asocia con  $\omega < 0$  mientras que el signo - con  $\omega > 0$ . Como se indica en la ecuación 6.3 el espectro tiene una componente elástica, primer término de ecuación 6.3 y una curva continua, la densidad de estados de fotones que se extiende a ambos lados de la región  $\omega=0$ . Cuando el término inelástico está bien separado del componente elástico, como en nuestro caso,  $S_{vib}(Q, \omega=0)$  se puede aproximar por el primer término de la ecuación 6.3. Para difusión tipo Fick con coeficiente de difusión  $D$ , el factor de estructura dinámico es una función lorentziana cuya anchura a mitad de altura es  $DQ^2$  y viene dada por

$$S_{tran}(Q, w) = \frac{1}{\pi} \frac{DQ^2}{(DQ^2)^2 + w^2} \quad (6.4)$$

Entonces se puede escribir,

$$S_{inc}(Q, w) = \exp(-\langle u^2 \rangle Q^2/3)\delta w \otimes \frac{1}{\pi} \frac{DQ^2}{(DQ^2)^2 + w^2} \quad (6.5)$$

### Análisis de la dispersión elástica

En un espectrómetro de alta resolución como IN 10 la intensidad elástica es una buena medida de  $S_{inc}(Q, \omega=0)$  para los átomos de H de la cadena polimérica. En la figura 146 se muestra  $S_{inc}(Q, \omega = 0)$  normalizada a 190 K, en función de la temperatura, durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento. Tal como se observa en la figura, se pueden identificar tres regiones: (i) Por debajo de 227K la intensidad disminuye linealmente al aumentar la temperatura y muestra un gran salto alrededor de esta temperatura correspondiendo a la fusión/congelación del  $D_2O$ . (ii) Para  $T > 277$  K la velocidad de disminución de la intensidad se hace mayor. (iii) A la temperatura de la transición de fase en volumen (307 K) se observa un salto en la intensidad la cuál recupera el comportamiento lineal a temperaturas más altas. Al contrario de lo que sucede en la mayoría de las transiciones de fase en las cuales la intensidad disminuye al aumentar la temperatura (ver por ejemplo la fusión del  $D_2O$  en la figura 146), la transición desde el estado hinchado al colapsado aumenta como un salto en el plot de la intensidad frente a T. A 307 K hay más neutrones que caen dentro de la ventana de energía indicando que se han producido algunas restricciones en el movimiento molecular durante el barrido de calentamiento y la situación contraria durante el enfriamiento puesto que el proceso es reversible tal y como puede verse en la figura 146.

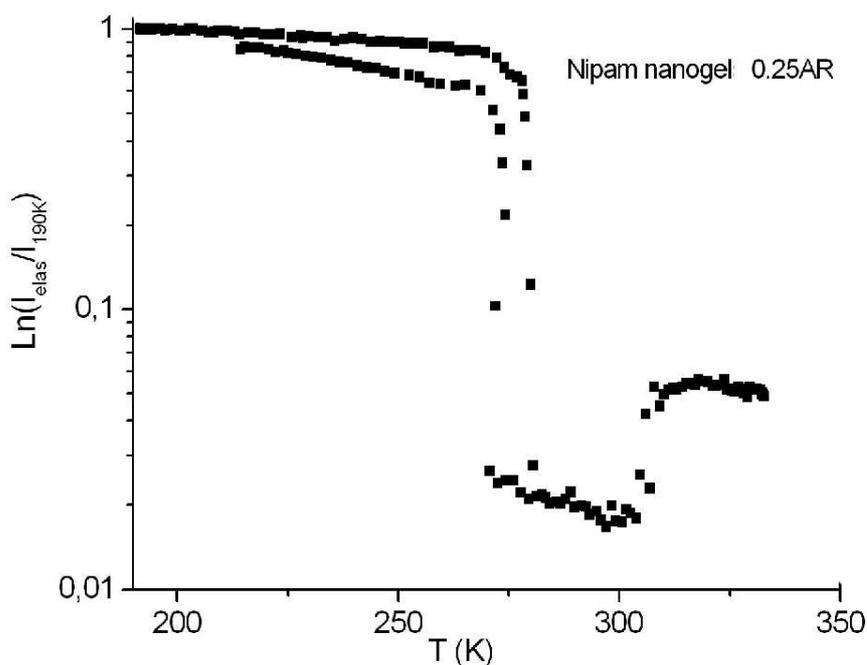
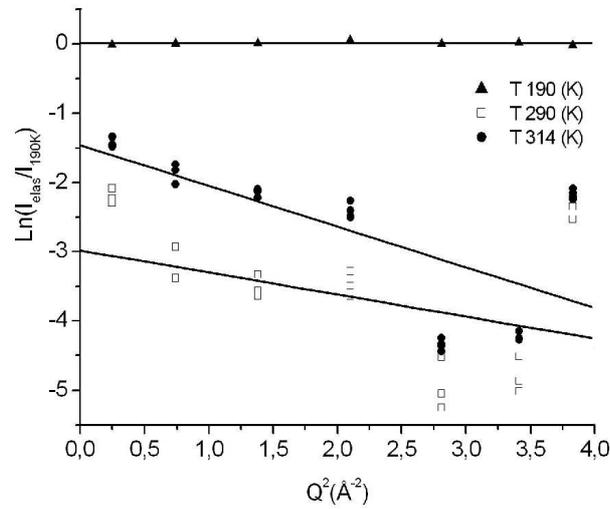


Fig. 146 Logaritmo de la intensidad en función de la temperatura.

La escala espacial del movimiento vibracional, la raíz cuadrada de la amplitud de vibración  $\langle u^2 \rangle^{1/2}$  se puede obtener a partir del análisis de la dependencia en  $Q$  de la intensidad elástica a temperatura fija tal como se muestra en la figura 147.

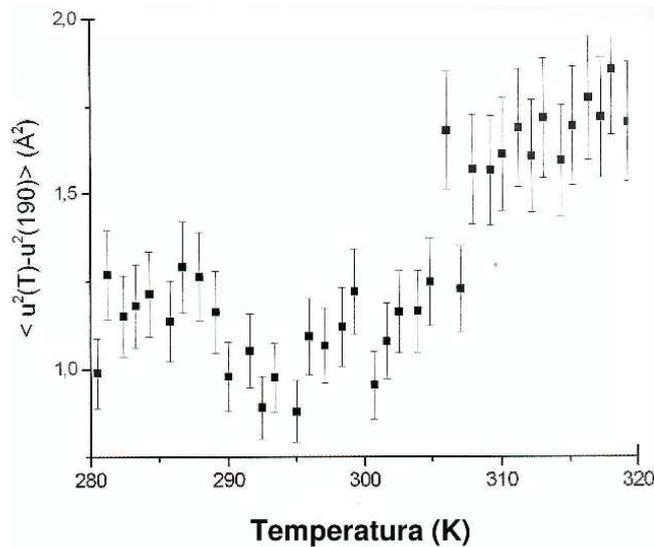


**Fig. 147** Intensidad elástica vs  $Q^2$ .

Dado que la intensidad esta normalizada a 190 K, se obtiene;

$$\ln \frac{S_{inc}(Q, w = 0)}{S_{inc}(Q, w = 0)_{190K}} = - [\langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(190K) \rangle] Q^2 \quad (6.6)$$

La dependencia con la temperatura de  $\Delta \langle u^2 \rangle = \langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(190) \rangle$  se muestra en la figura 148. La variación lineal de  $\Delta \langle u^2 \rangle$  con T corresponde a comportamiento armónico. Sin embargo, cuando nos aproximamos a la temperatura de la transición, desde la región de temperatura baja, se puede observar que  $\Delta \langle u^2 \rangle$  oscila y exhibe un aumento en salto de alrededor  $0,5 \text{ \AA}^2$  en la TVF.



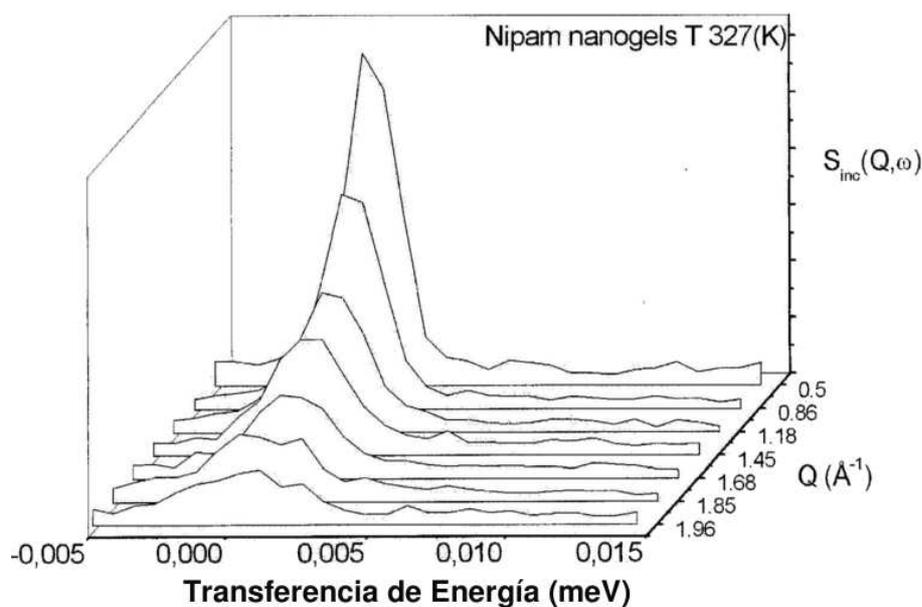
**Fig. 148**  $\Delta \langle u^2 \rangle$  vs. temperatura.

La fuerza que dirige el hinchado de los geles es la energía libre de mezcla del polímero y el solvente la cual disolvería el polímero si las moléculas del mismo no estuvieran conectadas mediante moléculas de entrecruzante. El volumen del gel aumenta hasta que el cambio de la energía elástica que se produce compensa la energía de mezcla y el gel alcanza el equilibrio. Usando un modelo de red de campo medio se puede derivar que la tensión en los finales de una cadena polimérica, separados una distancia  $r$ , consistente de  $N$  segmentos conectados por enlaces de longitud  $b$  esta dada por [136];

$$f = \frac{3k_bT}{Nb^2}r \quad (6.7)$$

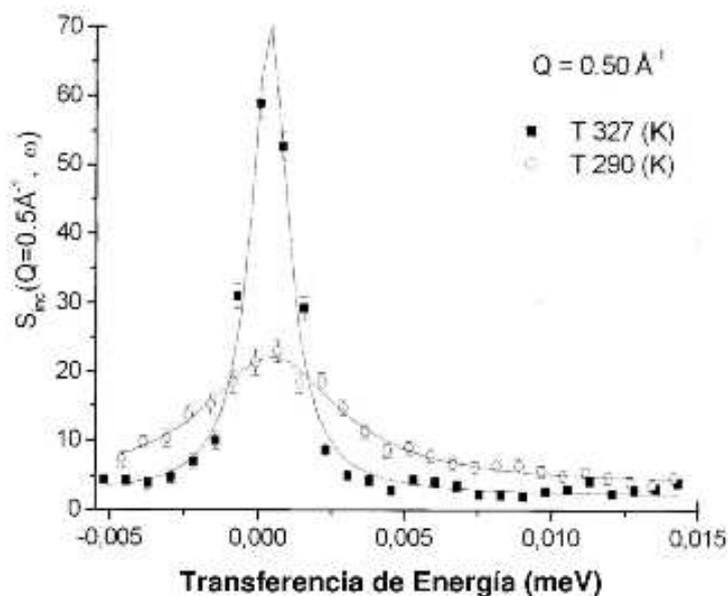
En el estado hinchado esta fuerza actuando en los puntos de entrecruzamiento mantiene las cadenas poliméricas estiradas, los protones en la cadena polimérica están sujetos a un potencial armónico y  $\Delta < u^2 > -1, 2\text{\AA}$ . Sin embargo este escenario cambia drásticamente cuando la temperatura se aproxima 307 K las moléculas de agua escapan y el microgel comienza a colapsar. Sin embargo por encima de esta temperatura el gel colapsado recobra el comportamiento armónico.

En los estudios de disoluciones de polímeros con dispersión de neutrones, la componente cuasielástica proviene de los movimientos de traslación del átomo dispersor, y este movimiento aparece convolucionado con el de vibración y rotación en la función de dispersión incoherente. Los movimientos de vibración en la región de transferencia de energía cercanas a cero se aproximan como factor Debye-Waller y se pueden separar fácilmente. Los movimientos de rotación generalmente son muy rápidos al menos bastante más rápidos que los de traslación. Esto implica que la componente que proviene de los movimientos de rotación es mucho más ancha que la asociada con movimientos difusivos y aparece como un fondo (casi plano) de poca intensidad que se ajusta como un fondo plano sobre el que aparece bien definida la componente traslacional, ensanchada tan solo por la convolución con la anchura experimental. Por tanto describimos la dependencia en  $Q$  de la intensidad dispersada por el microgel como una combinación de una función delta, que para transferencia de energía cero nos permitirá calcular el factor de Debye-Waller y una función Lorentziana que permitirá calcular los movimientos difusivos de los segmentos de cadena polimérica. El salto que se produce en la intensidad elástica a la temperatura de TFV indica un cambio en el tipo de movimiento traslacional que afecta a los centros dispersores. Por tanto hemos investigado la IQNS a 290 K y 327 K justo por debajo y por encima de la temperatura de la TFV. En la fase de gel hinchado la componente cuasielástica es pequeña y solo puede distinguirse del fondo en los dos detectores situados a bajo  $Q$  (0.5 y 0.86  $\text{\AA}^{-1}$ ). Por el contrario a 327 K la intensidad es mucho mayor y puede medirse en los siete detectores del espectrómetro IN 10 tal como se muestra en la figura 149.



**Fig. 149** IQNS de las muestras de nanopartículas de NIPAM, a 327(K) en los diferentes detectores.

En la figura 150 se muestra el espectro de IQNS medido en el valor mas bajo de  $Q$  ( $0,5 \text{\AA}^{-1}$ ) a las dos temperaturas seleccionadas.



**Fig. 150** IQNS de las muestras de nanopartículas de NIPAM, a 290(K) y 327(K) usando  $Q(0,5 \text{\AA}^{-1})$ .

Los datos experimentales se representan por puntos y las líneas son el resultado del ajuste con la ecuación 8.4. A 290 K sólo para  $q = 0,5$  y  $0,86 \text{\AA}^{-1}$  se puede separar la componente cuasielástica del fondo. Así el comportamiento del microgel a 290 K es similar a polímeros en solución y la intensidad disminuye rápidamente al aumentar

q. Este no es el caso del espectro a 327(K) cuando el gel esta colapsado, donde puede apreciarse intensidad en los siete detectores. Del ajuste se obtiene la anchura ( $\Gamma$ ) de la componente cuasielástica. Para la difusión del centro de masa de un polímero en disolución,  $\Gamma = Dq^2$  donde D es el coeficiente de difusión dado por la ecuación de Stokes-Einstein  $D = kT/6\pi\eta r$ . La figura 151 muestra la representación de  $\Gamma$  vs.  $q^2$ .

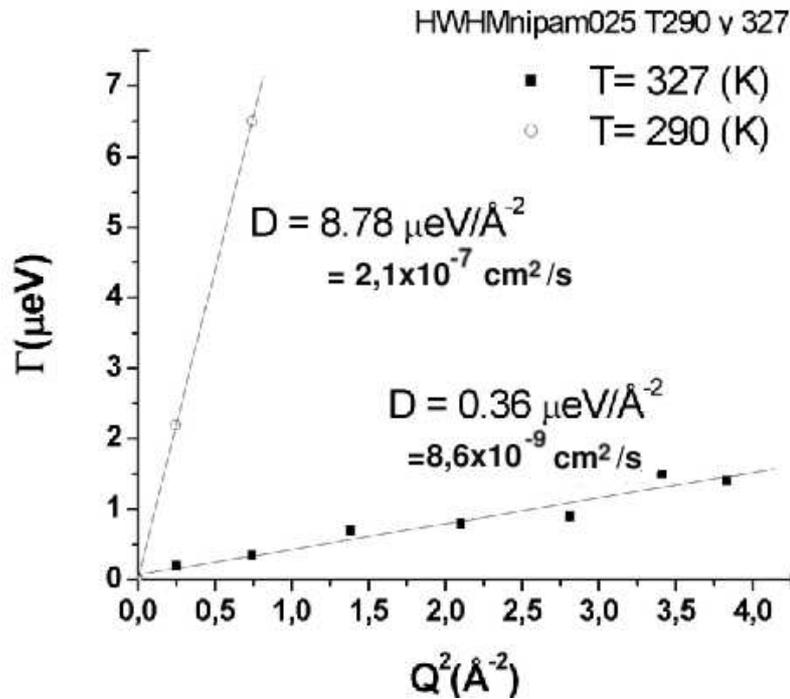


Fig. 151 Representación de  $\Gamma$  vs.  $q^2$ .

La componente cuasielástica observada a 327 K parece indicar que la red polimérica colapsada se comporta más como un polímero en estado sólido que en disolución con restricciones importantes del movimiento de los segmentos de la cadena del polímero.

### Posible aplicación de los microgeles de NIPAM en biotecnología

Una posible aplicación de estos microgeles, podría ser la preparación de sistemas de confinamiento enzimático inteligentes capaces de responder a distintos estímulos como pH temperatura etc.

# Capítulo 7

## Conclusiones

**1. Biosensores de primera generación.** Se han preparado cuatro tipos de biosensores de primera generación empleando como componente biológico micropartículas de polímero en las que se ha atrapado GOx.

**Biosensores basados en micropartículas de poli(acrilamida).** Estos presentan un rango lineal comprendido entre 0,09mM y 25mM con unos tiempos de respuesta de ~45s. Estos biosensores presentan problemas de selectividad con interferentes como el ácido ascórbico y el ácido úrico.

**Basados en micropartículas de poli(acrilamida-ácido acrílico).** Tienen las ventajas de las anteriores y además son selectivos a los interferentes ácido ascórbico y ácido úrico.

**Basados en micropartículas de poli(acrilato de magnesio).** Los biosensores preparados con este polímero presentan propiedades interesantes para su uso en medidas *"in vivo"*, no obstante, debido a los largos tiempos de respuesta del biosensor este polímero no es adecuado para su aplicación en biosensores.

**Basados en micropartículas de PCL.** Estos biosensores presentan rangos de linealidad comprendidos entre 0,09mM y 15mM, con tiempos de respuesta de 30s y estabilidad superior a 14 días.

**2. Biosensores de segunda generación.** Se han preparado biosensores de segunda generación basados en micropartículas de poli(acrilamida)-polipirrol en las que se atrapó GOX. Este biosensor tiene un rango de linealidad comprendido entre 0,09mM y 10mM y permite medir tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Además presenta tiempos de respuesta de 11s siendo selectivo a interferentes presentes en el suero como el ácido úrico y ácido ascórbico. La estabilidad se ve afectada por la intensidad de corriente generada durante la estabilización del potencial de lectura previo a la medida. La corriente generada en este proceso se transmite al enzima a través del polímero conductor reduciendo la estabilidad del dispositivo.

**3. Biosensores de tercera generación** Se ha desarrollado un nuevo tipo de biosensor amperométrico basado en diamante NCD con superficie oxidada y reducida como material soporte e inmovilizando el enzima *Horse radish* peroxidasa, para detectar peróxido de hidrógeno. El biosensor preparado con superficie NCD-reducida tiene una constante de transferencia electrónica de  $0,066s^{-1}$  y un rango lineal entre 0.1 y 45mM y un tiempo de repuesta de 10 segundos. El diamante preparado con superficie NCD oxidada tiene un rango de linealidad entre 1mM y 45mM, un tiempo de respuesta de 10 segundos y una estabilidad superior a 15 días.

**4. Estudio estructural de las micropartículas poliméricas con y sin enzima** Se han estudiado las modificaciones estructurales que se producen en la red polimérica cuando se encapsula el enzima, con difracción de rayos X, difracción de neutrones y DSC. Tanto en el caso de las micropartículas de poli(acrilamida) como en las de poli(AMgA), al inmovilizar el enzima se modifica la red polimérica apareciendo una nueva distancia de correlación. Todas las micropartículas presentan estructura amorfa a excepción de las de PCL que son semicristalinas. Se ha encontrado que la transición vítrea de los polímeros amorfos se modifica cuando se incorpora en la red polimérica un enzima.

**5. Estudio de dinámica molecular en nanopartículas de PNIPAM** Se han sintetizado microgeles de PNIPAM en los que se ha estudiado la dinámica de las cadenas poliméricas mediante dispersión cuasielástica de neutrones y se han calculado los parámetros asociados a los movimientos de vibración y traslación que ocurren en las cercanías de la transición de volumen. Los valores obtenidos con IQNS parecen indicar que estamos observando movimientos locales de segmentos de la cadena polimérica los cuales quedan parcialmente congelados ó se restringen debido a que cuando el polímero colapsa no hay volumen libre disponible para que el segmento pueda moverse debido a la proximidad de las otras cadenas.

# Apéndice A

## Abreviaturas

- $\alpha$  ; Constante de proporcionalidad de los procesos electródicos  
 $\chi$  ; Grado de reticulación  
 $\Delta G_{el}$  ; Energía libre  
 $\Delta G_i$  ; Energía libre de interacciones electrostáticas  
 $\Delta G_m$  ; Energía libre de mezcla  
 $\Delta H_w$  ; Entalpía de evaporación del agua  
 $\epsilon CL$  ;  $\epsilon$ -caprolactona  
 $\epsilon_0$  ; Constante dieléctrica en vacío  
 $\epsilon_r$  ; Constante dieléctrica del medio  
 $\gamma$  ; Número de enlaces flexibles en una molécula de reticulante  
 $\nu$  ; Anchura de las regiones enfrentadas entre las que puede existir fenómeno túnel  
 $\phi$  ; Fracción de volumen del polímero  
 $\rho$  ; Fracción de volumen de la fase interna de una emulsión  
 $\Gamma$  ; Promedio de superficie cubierta  
 $\delta$  ; Ángulo de contacto  
 $\xi$  ; Distancia de correlación  
 $A$  ; Factor de frecuencia  
 $A_r$  ; Área del electrodo  
 $AC$  ; ácido acrílico  
 $Ag/AgCl$  ; Electrodo de referencia de plata cloruro de plata  
 $AM$  ; Acrilamida  
 $AMgA$  ; Acrilato de Magnesio  
 $APTES$  ; Amino propiltriétoxissilano  
 $BIS$  ;  $NN'$  metileno bisacrilamida  
 $BnzOH$  ; Alcohol bencílico  
 $C_d$  ; Capacidad de la doble capa  
 $C_p$  ; Capacidad calorífica  
 $C_{prot}$  ; Capacidad de la proteína  
 $C_w(\%)$  ; Porcentaje de agua absorbida por la matriz polimérica  
 $d$  ; Distancia de separación de dos puntos entre los que puede haber el efecto túnel  
 $DSC$  ; Calorimetría diferencial de barrido  
 $E_a$  ; Energía de activación

$E_g$  ; Energía de separación entre bandas  
 $E_{pa}$  ; Potencial del pico anódico  
 $E_{pc}$  ; Potencial del pico catódico  
 $EDC$  ; 1-etil-3,3 dimetil amin-carboxiimida  
 $f$  ; frecuencia en Hz  
 $F$  ; Constante de Faraday  
 $GOx$  ; Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*  
 $HRP$  ; Peroxidasa de Horse Radish  
 $i_k$  ; Intensidad de corriente generada cuando  $[S] < K_m^{ap}$   
 $i_{max}$  ; Intensidad de corriente máxima generada cuando  $[S] \gg \gg K_m^{ap}$   
 $IR$  ; Espectroscopia de infrarrojo  
 $K$  ; Constante de proporcionalidad dieléctrica  
 $K_{esp}$  ; Constante de especificidad  
 $K_m^{ap}$  ; Constante de Michaelis Menten del enzima inmovilizada  
 $K_t$  ; Constante de transferencia electrónica  
 $n$  ; Número de electrones  
 $n^h$  ; Índice de hill  
 $NCD$  ; Diamante nanocristalino  
 $NHS$  ; N hidroxilsuccinamida  
 $NIPAM$  ; N isopropil acrilamida  
 $P_e$  (%) ; Porcentaje de polícaprolactona disuelto en la fase oleosa  
 $PAPPy$  ; Mezcla poli(acrilamida)-polipirrol  
 $PAS$  ; Peróxido sulfato de sodio  
 $PBS$  ; Solución reguladora de potasio  
 $PCL$  ; Policaprolactona  
 $PPy$  (%) ; Polipirrol  
 $PSS$  ; Poliestirensulfonato sódico  
 $Py$  ; Pirrol  
 $R_\Omega$  ; Resistencia de la solución  
 $R_c$  ; Resistencia del circuito  
 $SCE$  ; Electrodo de calomelanos saturados  
 $SEM$  ; Microscopia electrónica de barrido  
 $SnF_3$  ; Trifluoro sulfonato de estaño II  
 $T_g$  ; Temperatura de transición vítrea  
 $TEMED$  ;  $NNN'N'$  Tetrametil-etilen-diamina  
 $TFA$  ; N 9-deceniltrifluoro acetamida  
 $v$  ; Velocidad de barrido V/s  
 $V_{max}^{ap}$  ; Velocidad máxima aparente  
 $w$  ; Frecuencia angular rad/s  
 $XPS$  ; Espectroscopia de emisión fotónica

# Apéndice B

## Trabajos publicados

# Bibliografía

- [1] C.K. Chiang, Y. W. Park, A.J. Heeger, H. Shirakawa, E.J. Louis, A. G. MacDiarmid, *J. Chem. Phys.*, 69, 5098, **(1978)**
- [2] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger, *J. Chem. Soc. Chem. Comms.*, 80, 578, **(1977)**
- [3] T.C. Chou , K.M. Ng, S.H. Wang, *Sens. Actuators B*, 66, 184, **(2000)**
- [4] D. Li, Y. Jiang, Z. Wu, X. Chen, Y. Li, *Sens. Actuators B*, 66, 125, **(2000)**
- [5] H. N. Choi, M. A. Kim, W. Lee, *Anal. Chim. Acta*, 537, 179, **(2005)**
- [6] M. Emilia, G. Brett, *Anal. Chim. Acta*, 532, 145, **(2005)**
- [7] T. Ciach, L. Grado, *J. Aer. Sci.*, 27, S613, **(1996)**
- [8] B. Krajewska, *Sep. Pur. Tech.*, 41, 305, **(2005)**
- [9] G. Crini, *Prog. Polym. Sci.*, 30, 38, **(2005)**
- [10] E. Guibal, *Sep. Pur. Tech.*, 38, 43, **(2004)**
- [11] S. Petrov, V. Nenov, *Desal.*, 162, 201, **(2004)**
- [12] C. Lo, K. Lin, G. HsiueT, *J. Con. Rel. en prensa*, **(2005)**
- [13] S. Hara, T.i Zama, W. Takashima, K. Kaneto, *Synth. Met.*, 149, 199, **(2005)**
- [14] M.A. Careem, K.P. Vidanapathirana, S. Skaarup, K. West, *Sol. Sta. Ion.*, 175, 725, **(2004)**
- [15] T. F. Otero, I. Boyano, M. T. Cortés, G. Vázquez, *Electro. Acta*, 49, 3719, **(2004)**
- [16] T. Guo, Y. Xia, J. Wang, M. Song, B. Zhang, *Biomaterials*, 26, 5737 **(2005)**
- [17] A. Ersöz, A. Denizli, A. Özcan, R. Say, *Biosens. Bioelectron*, 20, 2197, **(2005)**
- [18] M. Syu, Y. Nian, *Anal. Chim. Acta*, 539, 1, **(2005)**
- [19] S. Nagashima, S. Ando, K. Makino, T. Tsukamoto, H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.*, 197, 377, **(1998)**

- [20] D. Benda, J. Snuparek, V. Cermak, *Eur. Polym. J.*, 33, 1345, **(1997)**
- [21] M. Neru, K. D. Tapas, M. Amarnath, *J. Colloid. Interface Sci.* 190, 387-391, **(1997)**
- [22] J. Kulys, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 473, **(1999)**
- [23] M. Y. Aräca, G. Bayramolu, N. Bäçak, *Proc. Biochem.*, 39, 2007, **(2004)**
- [24] M. Pibyl, R. Chmelíková, P. Hasal, M. Marek, *Chem. Engin. Sci.*, 56, 433, **(2001)**
- [25] F. Scheller, F. Schubert, "Biosensors", Elsevier, Amsterdam, **(1992)**
- [26] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, 17, 345, **(2002)**
- [27] Newman, J.D., Warner, P.J., Turner, A.P.F., Tigwell, L.J., *Biosensors: A Clearer View*. Cranfield University, UK, 216, **(2004)**
- [28] J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi, *Sens. Actuators B*, 102, 179, **(2004)**
- [29] Y. Paitan, D. Biran, I. Biran, N. Shechter, R. Babai, J. Rishpon, E. Z. Ron, *Biotech. Adv.*, 22, 27, **(2003)**
- [30] S. Kroger, S. Piletsky, A. Turner, *Mar. Pol. Bul.*, 45, 24, **(2002)**
- [31] D. P. Nikolelis, M. G. Simantiraki, C. G. S. y K. Toth, *Anal. Chim. Acta*, 537, 169, **(2005)**
- [32] M. Kemal S. E. Dinçkaya, *Talanta*, 65, 998, **(2005)**
- [33] M. Keusgen, J. P. Kloock, D. -T. Knobbe, M. Jünger, I. Krest, M. Goldbach, W. Klein y M. J. Schöning, *Sens. Actuators B*, 103, 380, **(2004)**
- [34] M. Gerard, K. Ramanathan, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Electroanal.*, 12, 450, **(1999)**
- [35] K. Kurihara, H. Ohkawa, Y. Iwasaki, O. Niwa, T. Tobita y K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 523, 165, **(2004)**
- [36] P. I. Nikitin, M. V. Valeiko y B. G. Gorshkov, *Sens. Actuators B*, 90, 46, **(2003)**
- [37] K. Mosbach, B. Danielsson, *Anal. Chem.*, 53, 83, **(1981)**
- [38] Y. Zhang, S. Tadigadapa, *Biosens. Bioelectron.*, 19, 1733, **(2004)**
- [39] C. Teller, J. Halánek, A. Makower, D. Fournier, H. Schulze y F.W. Scheller, *Sens. Actuators B*, In Press, **(2005)**

- [40] P. Skládál, C. Santos-Riccardi , H. Yamanaka P. Inácio da Costa, J. Viro. Met., 117, 145, **(2004)**
- [41] N. M. Ratcliffe, Anal. Chim. Acta, 239, 257, **(1990)**
- [42] S. Martinoia, Gi. Massobrio y L. Lorenzelli, Sens. Actuators B, 105, 1, 14, **(2005)**
- [43] S. P. Massobrio, Biosens. Bioelectron., 19, 1487, **(2004)**
- [44] V. Vjacheslav, A. P. Soldatkin, A. A. Shul'ga, V. K. Rossokhaty, V. I. Strikha, A. V. El'skaya, Anal. Chim. Acta, 322, 77, **(1996)**
- [45] J. Kulys, Biosens. Bioelectron., 14, 473, **(1999)**
- [46] Y. W. Liou, C. M. Wang, J. Electroanal. Chem, 481, 102, **(2000)**
- [47] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, Anal. Chem., 66, 2451, **(1994)**
- [48] A. V. Lapierre, F. Battaglini, J. Raba, Anal. Chim. Acta, 443, 17, **(2001)**
- [49] N. J. Forrow, G. S. Sanghera, S. J. W. y J. L. Watki Biosens. Bioelectron., 20, 1617, **(2005)**
- [50] S. D. Varfolomeev, I. N. Kurochkin, A. I. Yaropolov, Biosens. Bioelectron., 9, 863, **(1996)**
- [51] W. Schumann, Review Molecular Biotechnology, 82, 425, **(2002)**
- [52] K.Ramanathan, R. Mehrotra, B. Jayaram, A. S. N. Murthy, Anal. Lett., 29, 1477, **(1996)**
- [53] A. Chaubey, M. Gerard, R. Singh, V. Singh, B.D. Malhotra, Electrochim. Acta 46, 723,**(2000)**
- [54] E. López-Cabarcos, D. Mecerreyes, B. Sierra-Martín, M. S. Romero-Cano, P. Strunz y A. Fernández-Barbero, PCCP, 6, 1396, **(2004)**
- [55] C. Pizarro, M.A. Fenández-Torroba, C. Benito, J.M. González-Saiz, Biotechnol. Bioeng., 53, 497, **(1997)**
- [56] J. M. Gonzalez-Saiz, C Pizarro, Eur. Polym. J., 37, 435,**(2000)**
- [57] M. Dinguizli, S. Jeumont, N. Beghein, J. He, T. Walczak, P.N. Lesniewski, H. Hou, O.Y. Grinberg, Artur Sucheta, H.M. Swartz y B. Gallez, Biosens. Bioelectron., In Press **(2005)**
- [58] R. Kurita, H. Tabei, Y. Iwasaki, K. Hayashi, K. Sunagawa O. Niwa, Biosens. Bioelectron., 20, 518, **(2004)**

- [59] Tejal A. Desai, Derek J. Hansford, Lara Leoni, Matthias Essenpreis y Mauro Ferrari, *Biosens. Bioelectron.*, 15, 453, **(2000)**
- [60] G. Zhou, G. Wang, J. Hong-Yuan, *Sens. Actuators B*, 81, 334, **(2002)**
- [61] P. C. Pandey, *J. Chem. Soc. Faraday Trnas. 1*, 2259, **(1986)**
- [62] C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P. G. Zambonin, *Anal. Chem.*, 62, 2735, **(1990)**
- [63] P. N. Bartlett, D. J. Caruana, *Analyst*, 117 1287, **(1992)**
- [64] J. C. Cooper, E. A. H. Hall, *Biosens. Bioelectron.* 14, 443, **(1999)**
- [65] H. M. Crowther, B. Saunders, S. J. Mears, T. Cosgrove, B. Vincent, S. M. Kinkg y G. Yu, *Colloids Surf.A*, 152, 327, **(1999)**
- [66] A. Fernandez-Barbero, A. Fernandez-Nieves, I. Grillo y E. López-Cabarcos, *Phys.Rev.E*, 66, 051803, **(2002)**
- [67] Ruckenstein, E., Ebert,G., Platz, G., *J.Colloid Interface Sci.* 133, 432, **(1990)**
- [68] D. Braun, H.Cherdom, H.Ritter, "Polymer Synthesis: Theory and Practice", Springer Verlag Berlin **(2001)**
- [69] C. Özeroglu, A.E. Kurtoglu, *E. Polym J.* 37, 1053-1059,**(2001)**
- [70] M. E. Silva, E. R. Dutra, V. Mano, J. C. Machado, *Polymer Degradation and Stability*, 67, 491, **(2000)**
- [71] M. Chaplin, C. Bucke, "Enzyme Technology", Cambrige University Press, Cambrige **(1990)**
- [72] P. J. Flory, *Proc. R. Sco. Lond. A*, 351, 351, **(1976)**
- [73] P. J. Flory, *Macromolecules*, 66, 5720, **(1977)**
- [74] P. J. Flory, *Macromolecules*, 12, 119, **(1979)**
- [75] N. Kayaman, O. Okay, B. M. Bayasal, *Polym. Gels Networks*, 5, 167, **(1997)**
- [76] T. F. Otero, M. Teresa Cortes, I. Boyano, *J. Electro. Chem.*, 562, 161, **(2004)**
- [77] T. F. Otero, M. T. Cortés, *Sens. Actuators.*, 96, 152, **(2003)**
- [78] S. Skaarup, L. Bay, K. Vidanapathirana, S. Thybo, P. Tofte, K. West, *Sol. Sta. Ion.*, 159, 143, **(2003)**
- [79] E. V. Piletska, M. Romero-Guerra, I. Chianella, K. Karim, A. P.F. Turner, Se. A. Piletsky, *Anal. Chim. Acta*, en prensa, **(2005)**

- [80] F. Horkay, A. M. Hecht, S. Mallam, E. Geissler, A. R. Renie, *Macromolecules*, 24, 2896, **(1991)**
- [81] F. Horkay, A. M. Hecht, S. Mallam, E. Geissler y A. R. Renie, *Macromolecules*, 24, 2896, **(1991)**
- [82] A. M. Hecht, R. Duplessix y E. Geissler, *Macromolecules*, 18, 2167, (1985)
- [83] Diabetes Action Now: an Initiative of the World Health Organisation and the International Diabetes Federation, Geneva, Switzerland **(2004)**
- [84] S. Rangelov, W. Brown, *Polym.*, 41, 4825-4830, **(2000)**
- [85] X. Xia, Z. Hu y M. Márquez, *J. Control. Release*, 103,21, **(2005)**
- [86] Y. Park, J. Liang, Z. y V. C. Yang, *J. Control. Release*, 75, 37, **(2001)**
- [87] D. Voet, J. G. Voet, "Biochemistry", John Wiley and Sons, New York, **(1990)**
- [88] L. Cumbal, J. Greenleaf, D. Leun, A. K. SenGupta, *Reac. Func. Polym.*, 54, 167, **(2003)**
- [89] P. Cañizares, A. Pérez, R. Camarillo, *Desal.*, 144, 279, **(2002)**
- [90] B. J. Rubio Retama, B. López Ruiz, E. López Cabarcos, , *Biomaterials*, 24, 2965, **(2003)**
- [91] A. Terreros Gomez B.J. Rubio Retama B. Lopez Ruiz P.A. Galera Gomez C. Rueda Rodriguez C. Arias Garcia E. Lopez Cabarcos, *Progr Colloid Polym Sci*, 123, 169 173, **(2004)**
- [92] H. Furukawa, *J. Mol. Struc.* 554, 11-19, **(2000)**
- [93] E. Lopez Cabarcos, J. Rubio Retama, B.Lopez Ruiz, M. Heinrich, A.Fernandez Barbero *Physica A*, 344, 417-423, **(2004)**
- [94] P. J. Flory "Principles of Polymer Chemistry", Cornell University Pres, New York, **(1975)**
- [95] M. Doi, "Introduction to Polymer Physics", Oxford University Press, New York, **(1996)**
- [96] M. Shibayama, H. Takahashi, S. Nomura, *Macromolecules*, 28, 6860, **(1990)**
- [97] V. Leskovac, S. Trivic, G. Wohlfahrt, J. Kandrak, D. Pericin, *IJBCB*, 37, 731, **(2005)**
- [98] D. G. Truhlar, A. Kohen, *PNAS*, 98, 848, **(2001)**
- [99] Coche-Guérente, A. Deronzier, P. Mailley, J.C. Moutet, *Anal. Chim. Acta*, 289, 143, **(1994)**

- [100] G. Giavaresi, M. Tschon, V. Borsari, J. H. Daly, J. J. Liggat, *Biomed. Pharm.*, 58, 411, **(2004)**
- [101] J.-C. Jeong, J. Lee, K. Cho, *J. Control. Release* 92, 249, **(2003)**
- [102] J. K. Jackson, L. S. Liang, W. L. Hunter, M. Reynolds, J. A. Sandberg, C. Springate, H. M. Burt, *Int. J. Pharm.* 243, 43, **(2002)**
- [103] B. Adhikari, S. Majumdar, *Progress in Polymer Science*, 29, 699, **(2004)**
- [104] S. Sosnowski, M. Gazinowski, S. Slomkowski, *Macromolecules*, 29, 4556, **(1996)**
- [105] M. Gazinowski, S. Sosnowski, S. Slomkowski, *Macromolecules*, 29, 6404, **(1996)**
- [106] Q. Zhang, E. E. Remsen, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 3642, **(2000)**
- [107] J. C. Jeong, J. Lee, K. Cho, *J. Con. Rel.* 92, 2, **(2003)**
- [108] D. L. Dorset, *Polym.* 38, 247, **(1997)**
- [109] A. Kiersnowski, P. Daübrowski, H. Budde, J. Kressler, J. Piglowski, *Eur. Polym. J.* 40, 2591, **(2004)**
- [110] M. Huang, S. Li, M. Vert, *Polym*, 45, 8675, **(2004)**
- [111] G. Markhan, T. M. Obey, B. Vincent, *Colloids Surf* 51, 239, **(1990)**
- [112] D.Mecerreyes, R.Stevens, C.Nyuyen, J.A.Pomposo, M.Bengoetxea, H.Grande, *Synth. Met.*, 126, 173, **(2002)**
- [113] L. H. Sperling, "Introduction to Physical Polymer Science", John Wiley & Sons, New York **(1992)**
- [114] F. Scheller, F. Schubert, "Biosensors", Elsevier, Amsterdam **(1992)**
- [115] D. Asnaghi, M. Giglio, A. Bossi y P. G. Righetti, *Macromolecules*, 30, 6194, **(1997)**
- [116] H. Takahashi, M. Sibayama y H. Fujisawa, *Macromolecules*, 28, 8824, (1995)
- [117] T. Ferri, A. Poscia, R. Santucci, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, 221, **(1998)**
- [118] J. Li, S. Dong, *J. Electroanal. Chem.* 431, 19, **(1997)**
- [119] H. Tsuji, T. Ono, T. Saeki, H. Daimon, K. Fujie., *Polym. Deg. Stab.*, en prensa, **2005**
- [120] C. Xiaohong, X. Huan, K, Jilie, D. Jiaqi, *Biosens. Bioelectron.*, 16, 115, **(2001)**
- [121] Laviron, E., *J. Electroanal. Chem.* 101, 19 /28, **(1979)**

- [122] P. J. Dowding, B. Vincent, E. Williams, *Coll. Int. Sci.*, 221, 268, **(2000)**
- [123] H. Tobita, M. Kumagai, N. Aoyagi, *Polymer*, 41, 481, **(2000)**
- [124] D. Poncelet, R. J. Neufeld, M. F. A. Goosen, B. Burgarski, V. Babak, *AIChE J.*, 45, 2018, **(1999)**
- [125] R. Saito, Y. Akiyama, M. Tanaka, K. Ishizu, *Coll. Surf. A*, 153, 1, 305, **(1999)**
- [126] G. Wang, R. Pelton, J. Zhang, *Coll. Surf. A*: 153, 1, 335, **(1999)**
- [127] H. Suzuki, A. Suzuki, *Coll. Surf. A*, 153, 87, **(1999)**
- [128] A. Matsumoto, K. Kodama, H. Aota, I. Capek, *Eur. Polymer J.*, 35, 1509, **(1999)**
- [129] H. M. Crowther, B. R. Saunders, S. J. Mears, T. Cosgrove, B. Vincent, S. M. King, *Coll. Surf. A*, 152, 327, **(1999)**
- [130] O. Okay, *Polymer*, 40, 4117, **(1999)**
- [131] P. Ulanski y J. M. Rosiak, *Beam Int. Mat. Atoms*, 151, 1, 356, **(1999)**
- [132] J. Li, S. Dong, *J. Electroanal. Chem.*, 431, 19, **(1997)**
- [133] J. Li, C. Guangjin, S. Dong, *J. Electroanal Chem.*, 416, 1, 97, **(1996)**
- [134] B.A. Kuznetsov, G.P. Shumakovich, O.V. Koroleva, A.I. Yaropolov, *Biosens. Bioelectron.*, 16, 73, **(2001)**.
- [135] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, "Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications", John Wiley and Sons, Segunda Edición. **(2001)**
- [136] M. Doi "Introduction to polymer physics", Oxford University Press Inc., New York, **(1996)**
- [137] A. Shukla, E. M. Guillam, D. J. Mitchell, P. V. Bernhardt, *Electrochem. Commun.*, 7, 437, **(2005)**
- [138] S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun., *Bioelechem.*, 67, 15, **(2005)**
- [139] Y. Huang, W. Zhang, H. Xiao, G. Li, *Biosens. Bioelectron.*, in press, **(2005)**
- [140] J. Chen, F. Yan, Z. Dai, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.*, 20, 431, **(2004)**
- [141] Rajesh, V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto, *Biomaterials*, 26, 3683, **(2005)**
- [142] H. M. Crowther, B. R. Saunders, S. J. Mears, T. Cosgrove, B. Vincent, S. M. King, G. Yu, *Col. Surf. A*, 152, 327, **(1999)**
- [143] I. Lee, K. Akiyoshi, *Biomaterials*, 25, 2911, **(2004)**

- [144] V. V. Shumyantseva, S. Carrara, V. Bavastrello, D. J. Riley, T. V. Bulko, K. G. Skryabin, A. I. Archakov, C. Nicolini, *Biosens. Bioelectron.*, in press **(2004)**
- [145] J. M. Rosiak, I. Janik, S. Kadlubowski, M. Kozicki, P. Kujawa, P. Stasica, P. Ulanski, *NIMB*, 208,325, **(2003)**
- [146] Y. Nomura, M. Ikeda, N. Yamaguchi, Y. Aoyama, K. Akiyoshi, *FEBS*, 553, 271, **(2003)**
- [147] Laviron, E., *J. Electroanal. Chem.* 101, 19 /28, **(1979)**
- [148] E. I. Iwuoha, D. Saenz de Villaverde, N. P. Garcia, M. R. Smyth, J. M. Pingarron, *Biosens. Bioelectron.*, 12, 749, **(1997)**
- [149] Elena E. Ferapontova, *Electrochimica Acta*, 49, 1751/1759, **(2004)**
- [150] Jinghong Li, Shaojun Dong, *J. Electroanal. Chem.*, 431 19-22, **(1997)**
- [151] Y. T. Kong, M. Boopathi, Y. B. Shim, *Biosens. Bioelectron.* 19, 227, **(2003)**
- [152] L. Zhang, X. Lin, *Biosens. Bioelectron.*, in press, **(2005)**
- [153] B. Piro, L. A. Dang, M. C. Pham, S. Fabiano, C. Tran-Minh, *J. Electroanal. Chem.* 512 (1/2), 101, **(2001)**
- [154] Ilmain F, Tanaka T, Kokufuta E, *Nature*, 349, 400, **(1992)**
- [155] Zhang YQ, Tanaka T, Shibayama M, *Nature* , 360, 142, **(1992)**
- [156] Saunders B.A. *Langmuir*, 20, 3925, **(2004)**
- [157] M. Doi, "Introduction to Polymer Physics", Oxford University Press Inc., New York, **(1996)**
- [158] Sato y T.Tanaka, *J. Chem. Phys.*, 89, 1695, **(1988)**
- [159] M. J. Murray and M.J.Snowden, *Adv.Colloid Interface Sci.* , 54, 73, **(1995)**
- [160] M. Shibayama y Y.Isaka, *Macromolecules*, 32, 7086-7092,**1999**
- [161] M. Shibayama, H. Takahashi, S.Nomura, *Macromolecules*, 28 6860-6864, **(1995)**
- [162] H. Takahashi, M. Shibayama and H.Fujisawa *Macromolecules*, 28, 8824-8828, **(1995)**
- [163] D.Asnaghi, M.Giglio, A.Bossi, P.G.Righetti, *Macromolecules*, 30, 6194-6198, **(1997)**
- [164] R.Pelton, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 85,1, **(2000)**

- [165] E. Lopez Cabarcos, D.Mecerreyes, B.Sierra-Martin, M.S.Romero Cano, P.Strunz, A.Fernandez Barbero, *Phys.Chem.Chem.Phys*, 6, 1396, **(2004)**
- [166] E. Lopez Cabarcos, F.Batallan, B.Frick, T.Ezquerria and F.J.Balta Calleja, *Phys.Rev.B*, 50, 13214, **(1994)**
- [167] B. R. Saunders, H. M. Crowther, G. E. Morris, S. J. Mears, T. Cosgrove, B. Vincent, *Coll. Surf. A*, 149, 57, **(1999)**
- [168] H. Xiong, H. Li, Z. Wang, X. Zhang, J. Shen, M. Gleiche, L. Chi, H. Fuchs, *J. Coll. Int. Sci.*, 211, 238,**(1999)**
- [169] T. Saitoh, F. Satoh, M. Hiraide, *Talanta*, 61, 811, **(2003)**
- [170] D. Poncelet, V. G. Babak, R. J. Neufeld, M. F. A. Goosen, B. Burgarski, *Adv. Coll. Int. Sci.*, 79, 213, **(1999)**
- [171] H. Suzuki, E. Kokufuta, *Coll. Surf. A*, 147, 233, **(1999)**
- [172] R Saito, Y. Akiyama, K. Ishizu, *Polym.*, 40, 655, **(1999)**
- [173] C. Ouwerx, N. Velings, M. M. Mestdagh, M. A. V. Axelos, *Polym. Gel. Networks*, 6, 393, **(1998)**
- [174] C. B. Agbugba , B. A. Hendriksen , B. Z. Chowdhry and M. J. Snowden, *Coll. Surf. A*, 137, 155, **(1998)**
- [175] P. Ulanski , I. Janik and J. M. Rosiak, *Rad. Phys. Chem.*, 52, 289, **(1998)**
- [176] M. I. Del-Val, C. Otero, *J. Mol. Cat. B*, 4, 37, **(1998)**
- [177] A. Pawlak, M. Pluta, J. Morawiec, A. Galeski, M. Pracella, *Eur. Polym. J.*, 36, 1875, **(2000)**
- [178] N. Hatto, T. Cosgrove, M. J. Snowden, *Polymer*, 41, 7133, **(2000)**
- [179] T. Pakula, *J. Mol. Liq.*, 86, 109, **(2000)**
- [180] C. Schunicht, A. Biffis and G. Wulff, *Tetrahedron*, 56, 1693, **(2000)**
- [181] R. Pelton, *Adv. Coll. Int. Sci.*, 85, 1, **(2000)**
- [182] J. Mrkic, B. R. Saunders, *J. Coll. Int. Sci.*, 222, 75, **(2000)**
- [183] Z. S. Nurkeeva, V. V. Khutoryanskiy, G. A. Mun, A. B. Bitekenova, S. Kadlubowski, Y. A. Shilina, P. Ulanski, J. M. Rosiak, *Col. Surf. A*, 236, 141, **(2004)**
- [184] C. Mousty, *Clay*, 27, 159, **(2004)**
- [185] J. J. La Scala, Jo. A. Orlicki, C. Winston, E. J. Robinette, J. M. Sands, G. R. Palmese, *Polymer*, 46, 2908, **(2005)**

- [186] V. Castro-Lopez, J. Hadgraft, M.J. Snowden, *Int. J. Pharm.*, 292, 137, textbf(2005)
- [187] H.A. Abd El-Rehim, *Radiation Physics and Chemistry*, en prensa, **(2005)**
- [188] A.G. Balabanyan, E.Yu. Kramarenko, I.A. Ronova and A.R. Khokhlov, *Polym.*, en prensa, **(2005)**
- [189] A. M. Fuxman, K. B. McAuley, L. J. Schreiner, *Chemical Engineering Science*, 60, 1277, **(2005)**
- [190] P. Pasetto, S. C. Maddock, M. Resmini, *Anal. Chim. Acta*, en prensa, **(2005)**
- [191] P. Verdugo, A. L. Alldredge, F. Azam, D. L. Kirchman, U. Passow, Peter H. Santschi, *Mar. Chemistry*, 92, 67 **(2004)**
- [192] D. Burgentzlé, J. Duchet, J. F. Gérard, A. Jupin, B. Fillon, *J. Coll. Int. Sci.*, 278, 26, **(2004)**
- [193] P. Natarajan, C. Raja, *Eur. Poly. J.*, 40, 2291, **(2004)**
- [194] L. Dauginet-De Pra, S. Demoustier-Champagne, *Polym.*, 46, 1583, **(2005)**
- [195] A. Varesano, L. Dall'Acqua, C. Tonin, *Polym. Deg. Sta.*, 89, 125, **(2005)**
- [196] E. Ünür, L. Toppare, Y. Yagci, F. Yilmaz, , *Mat. Chem. Phy.*, 91, 261 **(2005)**
- [197] M. Omastová, K. Boukerma, M. M. Chehimi, *Mat. Res. Bull.*, 40, 749, **(2005)**
- [198] T. Tüken, B. Yazıcı, M. Erbil, *App. Surf. Sci.*, en prensa, **(2005)**
- [199] T. Tüken, B. Yazıcı and M. Erbil, *Prog. Org. Coat.*, 53, 38 **(2005)**
- [200] X. Yang, Y. Lu, *Polym.*, en prensa, **(2005)**
- [201] F. Nastase, D. Mihaiescu, C. Nastase, C. Mirea, I. Burzo, Ioan Stamatina, *App. Sci. Man.*, 36, 503, **(2005)**
- [202] N. Izaoumen, D. Bouchta, H. Zejli, M. El Kaoutit, A. M. Stalcup, K. R. Temsamani, *Tal.*, 66, 111, **(2005)**
- [203] S. Cho, W. Kim, G. Jeong, Y. Lee, *Coll. Surf.*, 255, 79, **(2005)**
- [204] A. Khan, I. Mezbaul, M. Mezbaul, *Mat. Res. Bull.*, 40, 289, **(2005)**
- [205] C. Weidlich, K.-M. Mangold, K. Jüttner, *Elec. Acta*, 50, 1547, **(2005)**
- [206] L. Dauginet-De Pra, S. Demoustier-Champagne, *Polym.*, 46, 1583, **(2005)**
- [207] Y. Liu, S. Yang, *Elec. Acta*, en prensa, **(2005)**

- [208] T. Tüken, B. Yazici, M. Erbil, *Prog. Org. Coat.*, 51, 205, **(2004)**
- [209] C.M. Li, C.Q. Sun, W. Chen, L. Pan, *Surf. Coat. Tech.*, en prensa, **(2004)**
- [210] T. Tüken, B. Yazici, M. Erbil, *Prog. Org. Coat.*, 51, 152, **(2004)**
- [211] T. Tüken, G. Arslan, B. Yazici and M. Erbil, *Corr. Sci.*, 46, 2743, **(2004)**
- [212] K. Sunderland, P. Brunetti, L. Spinu, J. Fang, Z. Wang, W. Lu, *Mat. Lett.*, 58, 3136, **(2004)**
- [213] F. Szydło, B. Andrioletti, E. Rose, C. Duhayon, *Tetra. Lett.*, 45, 7363, **(2004)**
- [214] K. Jang, H. Lee, B. Moon, *Synth. Met.*, 143, 289, **(2004)**
- [215] M. Song , Y. Kim , B. Kim , J. Kim , K. Char, H. Rhee, *Synth. Met.*, 141, 315, **(2004)**
- [216] V. Syritski, K. Iida and A. Öpik, *Synth. Met.*, 144, 235, **(2004)**
- [217] Emese Kriván, G. Peintler, Csaba Visy, *Elec. Acta*, 50, 1529, **(2005)**
- [218] B.H. Kim, D.H. Park, J. Joo, S.G. Yu, S.H. Lee, *Synth. Met.*, en prensa, **(2005)**
- [219] S. Serradilla Razola, B. Lopez Ruiz, N. Mora Diez, H. B. Mark, Jr and J-M. Kauffmann, *Biosen. Bioelectron.*, 17, 921, **(2002)**
- [220] M. Shin, H. C. Yoon, H. Kim, *Anal. Chim. Acta*, 329, 223, **(1996)**
- [221] I. Kaneda, A. Sogabe, H. Nakajima, *J. Coll. Int. Sci.*, 275, 450, **2004.**
- [222] I. Kaneda, B. Vincent, *J. Coll. Int. Sci.*, 274, 49, **(2004)**
- [223] R. J. Russell, A. C. Axel, K. L. Shields, M. V. Pishko, *Polym.*, 42, 4893, **(2001)**
- [224] P. L. J. Zitha, G. Chauveteau, L. Léger, *J. Coll. Int. Sci.*, 234, 269, **(2001)**
- [225] J. Shen, L. Wang, X. Zhang, *Coll. Surfaces A*, 175, 1, 235, **(2000)**
- [226] K. Dusek and M. Dusková-Smrková, *Prog. Polym. Sci.*, 25, 1215, **(2000)**
- [227] K. Kratz, T. Hellweg, W. Eimer, *Coll. Surfaces A*, 170, 137, **(2000)**
- [228] J. Seidel, V. T. Pinkrah, J. C. Mitchell, B. Z. Chowdhry, M. J. Snowdem, *Therm. Acta*, 414, 47, **(2004)**
- [229] M. Ulbricht, *J. Chromatography B*, 804, 113, **(2004)**
- [230] C. Ménager , O. Sandre , J. Mangili, V. Cabuil, *Polym.*, 45, 2475, **(2004)**

- [231] V. J. Cornelius , M. J. Snowden , J. Silver and G. R. Fern, *React. Funct. Polym.*, 58, 165, **(2004)**
- [232] R. J. Hall, V. T. Pinkrah, B. Z. Chowdhry, M. J. Snowden, *Coll Surface A*., 233, 25, **2004**.
- [233] A. Pich, Y. Lu, V. Boyko, K. Arndt, H. P. Adler, *Polym.*, 44, 7651, **(2003)**
- [234] P. Hazot, T. Delair, C. Pichot, J. Chapel, A. Elaissari, *Comp. Rend. Chim.* 6, 11, 1417, **(2003)**
- [235] D. Gan, L. Andrew Lyon, *Anal. Chim. Acta*, 496, 53, **(2003)**
- [236] A. Matsumoto, M. Fujihashi, H. Aota, *Eur. Polym. J.*, 39, 2023, **(2003)**
- [237] A. Omari, G. Chauveteau, R. Tabary, *Coll. Surfaces A*: 225, 37, **(2003)**
- [238] T. Schmidt, C. Querner, K. Arndt, *Beam Inter. Mat. Atoms*, 208, 331, **(2003)**
- [239] R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Inter. J. Pharm.*, 258, 1, 165, **(2003)**
- [240] J. Rose, G. Chauveteau, R. Tabary, S. Moustier and J. -L. Hazemann, *Coll. Surfaces A*, 217, 159, **(2003)**
- [241] L. Bromberg, V. Alakhov, *J. Controll. Release*, 88, 11, **(2003)**
- [242] E. Bartsch, T. Eckert, C. Pies and H. Sillescu, *J. Non-Crystalline Solids*, 307, 802, **(2002)**
- [243] H. Vihola, A. Laukkanen, J. Hirvonen, H. Tenhu, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 16, 1, 69, **(2002)**
- [244] Y. Kim, H. Kim, J. Hong, *Surf. Coat. Tech.*, 153, 284, **(2002)**
- [245] K. Kratz, A. Lapp, W. Eimer, T. Hellweg, *Coll. urfaces A*, 197, 55, **(2002)**
- [246] Y. Dziechciarek, J. J. G. van Soest, A. P. Philipse, *J. Coll. Int. Sci.*, 246, 48, **(2002)**
- [247] M. Ghiass, A. D. Rey, B. Dabir, *Polymer*, 43, 989, **(2002)**
- [248] R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, Angel Concheiro, *J. Controll Release*, 77, 69, **(2002)**
- [249] L. Ye, P. A. G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Chim, Acta*, 435, 187, **(2001)**
- [250] J. E. Elliott, L. G. Lovell, C. N. Bowman, *Dent. Mat.*, 17, 221, **(2001)**
- [251] S. Ghosh, O. Inganäs, *Synt. Met.*, 101, 1, 413, **(1999)**