

ESPECTROSCOPIA DE CAPACITANCIA ELECTROQUÍMICA EN LA
DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA AFINIDAD DE INTERACCIÓN DE
FÁRMACOS ANTI-MITÓTICOS CON β -TUBULINA

SANDRA PATRICIA CORZO MANTILLA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2021

ESPECTROSCOPIA DE CAPACITANCIA ELECTROQUÍMICA EN LA
DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA AFINIDAD DE INTERACCIÓN DE
FÁRMACOS ANTI-MITÓTICOS CON β -TUBULINA

SANDRA PATRICIA CORZO MANTILLA

Trabajo de Grado para optar al título de
Doctora en física

Directores

David Alejandro Miranda Mercado
Doctor en física

Paulo Roberto Bueno
Doctor en Físico Química Teórica

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2021

A Mario Enrique

q.e.p.d.

"Si quieren ustedes estudiar a un hombre y conocer su alma, no presten atención a la forma que tenga de callarse, de hablar, de llorar, o a la forma en que se conmueva por las más nobles ideas. Miradlo más bien cuando ríe. Si ríe bien, es que es bueno".

Fiódor Dostoievski, *El adolescente*.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, David Alejandro Miranda, gran maestro y excelente colega, por la orientación, confianza y dedicación en este trabajo y especialmente por sus enseñanzas y su apoyo invaluable.

Al Profesor Paulo Roberto Bueno por la asesoría y por abrirme las puertas del grupo NANOBIONICS durante mi pasantía de investigación.

A los profesores Stelia Carolina Méndez, Ángel Manuel Meléndez, Rogelio Ospina por sus comentarios, aportes y retroalimentación durante los seminarios y por facilitarme los laboratorios GIBIM, CIMBIOS y el laboratorio de electroquímica para el trabajo experimental.

A Sandra, Edgar, Erika, Fredy, por el apoyo, por esas discusiones entre cafés que inspiraron la solución a diferentes situaciones

A todos mis colegas y compañeros de los grupos CIMBIOS, NANOBIONICS y del laboratorio de electroquímica que compartieron conmigo durante las diferentes etapas de este proyecto.

A mi madre y mis hermanos por su comprensión y apoyo incondicional y a mi padre (q.e.p.d.) por transmitirme su amor a los libros y el conocimiento.

¡A mis amigos, que saben estar cuando más los necesito!

GRACIAS

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. SUPERFICIE DE INTERACCIÓN	21
1.1. OBTENCIÓN DE LA SUPERFICIE DE INTERACCIÓN	23
1.1.1. Pretratamiento del electrodo de oro	24
1.1.2. Obtención de la Monocapa Autoensamblada (SAM) Mixta	26
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1.2.1. Electrodo Pre-tratados	27
1.2.2. Monocapa Autoensamblada Mixta	30
2. FUNCIONALIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL BIOSENSOR	33
2.1. INMOVILIZACIÓN DEL RECEPTOR Y MEDIDAS DE ECE	39
2.1.1. Inmovilización de β -Tubulina	39
2.1.2. Evaluación de respuesta del sensor por ECE	39
2.2. RESPUESTA DEL SENSOR POR ECE	42
2.2.1. Epotilona B	46
2.2.2. Docetaxel	51
2.2.3. Paclitaxel	53
3. INTERACCIÓN β-TUBULINA - FÁRMACO	57
3.0.1. Evaluación de la respuesta del sensor	62
3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN	65
3.1.1. Dureza química experimental	65
3.2. DUREZA QUÍMICA EFECTIVA	69

3.2.1. Dureza química efectiva de fármacos taxanos	74
3.2.2. Límites de detección y cuantificación	75
3.2.3. Afinidad de interacción β -Tubulina - Fármacos y capacidad de detección del sensor	77
4. CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1.	a. Representación de las moléculas 16-MHDA y FcC11 utilizadas en la construcción de la SAM. b. Representación ideal de una SAM mixta de 16-MHDA y FcC11.	22
Figura 2.	a. Electrodo de disco rotatorio de Metrohm Autolab. El electrodo está conformado por una barra de oro recubierta de un material aislante, de manera que solo queda expuesta su área transversa, un disco de 2mm de diámetro b. Pulido mecánico con óxido de aluminio	25
Figura 3.	Voltamperograma de un electrodo de <i>Au</i> en una solución 0.5 M de H_2SO_4 saturada con N_2 a 100 mV/s. La región sombreada representa la reducción de óxidos de oro y es la utilizada para calcular el área real del electrodo.	29
Figura 4.	Curva de CV obtenida para una SAM mixta de FcC11 y 16-MHDA (9:1) en $TBAClO_4$ 20 mM, con velocidad de barrido 100 mV/s.	31
Figura 5.	Esquema de la estructura de los microtúbulos formados por heterodímeros de tubulina. Se puede observar un modelo estructural de la β -Tubulina, diana farmacológica de los Taxanos.	34
Figura 6.	Diagrama de cintas de la estructura de la $\alpha \beta$ -Tubulina y el sitio de unión del taxol. Tomado de Orr, George A. y col Licencia número 5096030417852	35
Figura 7.	Esquema del sensor, sus componentes principales son un potenciostato PGSTAT-204, una celda electroquímica de tres puntas y una superficie de oro modificada que funciona como electrodo de trabajo.	40

Figura 8. Estructura química de los fármacos utilizados en la evaluación del sensor. Los tres fármacos fueron adquiridos de Sigma Aldrich. 40

Figura 9. Representación a. Sensor antes de interactuar con el fármaco, b. Circuito equivalente del sensor antes de interactuar con el fármaco c. Sensor después de interactuar con el fármaco d. Circuito equivalente, algunos centros redox inactivados por la interacción del fármaco con el sensor. 42

Figura 10. Gráfica ideal del espectro de capacitancia en el plano complejo, los cortes con el eje real representan la capacitancia a alta, $C_{\infty} = C^*(\omega \rightarrow \infty)$, y a baja frecuencia, $C_0 = C^*(\omega \rightarrow 0)$. Su diferencia determina la capacitancia redox $C_r = C_0 - C_{\infty}$. 45

Figura 11. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Eptilona B. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 $[mM]$ como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. $[mV/s]$ 47

Figura 12. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Eptilona B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 $[mM]$, las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 $[MHz]$ y 0.05 $[Hz]$ con voltaje pico-pico de 10 $[mV]$. 49

Figura 13. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Docetaxel. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 $[mM]$ como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. $[mV/s]$ 52

Figura 14. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Docetaxel B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 [mM], las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 [MHz] y 0.05 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV]. 53

Figura 15. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Paclitaxel. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 [mM] como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. [mV/s] 54

Figura 16. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Paclitaxel B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 [mM], las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 [MHz] y 0.05 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV]. 56

Figura 17. Representación del sistema molecular anclado sobre el electrodo de oro (amarillo) e inmersos en un medio electrolítico (azul), las moléculas ancladas contienen centros redox (círculos rojos y verdes) que intercambian un electrón con el sustrato, todo el sistema está expuesto a un potencial externo v . 58

Figura 18. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Epotilona B, utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[DCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos. 68

Figura 19. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Docetaxel, utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[DCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos. 70

Figura 20. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Paclitaxel utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[PCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos. 71

Figura 21. Esquema de la nube electrónica de la superficie de interacción del sensor antes y después de ser expuesto a un fármaco 73

Figura 22. Curvas de calibración utilizando como respuesta del sensor la dureza química efectiva, obtenidas con diferentes concentraciones de tres fármacos. 74

Figura 23. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de Eptilona B, $[EPO]$. 90

Figura 24. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de docetaxe, $[DCTX]$. 91

Figura 25. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de Paclitaxel, $[PCTX]$. 92

Figura 26. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria , C'' Vs f , para los experimentos realizados con epotilona B, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3. 93

Figura 27. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria , C'' Vs f , para los experimentos realizados con docetaxel, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3. 94

Figura 28. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria , C'' Vs f , para los experimentos realizados con paclitaxel, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3. 95

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1.	Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos para Épotilona, Docetaxel y Paclitaxel usando una calibración que depende de la superficie de interacción	72
Tabla 2.	Límites de detección LOD y de cuantificación LOQ calculados utilizando la dureza química efectiva η_{x-b} como respuesta del sensor.	76

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Dureza química efectiva de fármacos taxanos. Curvas de calibración	90
Anexo B. Diagramas de Bode de capacitancia real C'' e imaginaria C'''	93
Anexo C. Jupiter Notebook para el análisis de datos	96

GLOSARIO DE SIGLAS

16-MHDA Ácido 16 Mercaptohexadecanoico.

CV Voltamperometría Cíclica.

DCTXL Docetaxel

ECE Espectroscopia de Capacitancia Electroquímica.

EDC 1(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

EPO B Epotilona B

DFT Teoría del Funcional de Densidad (*Density Functional Theory*)

DMSO Dimetilsulfóxido.

FcC11 11 ferrocenil - 1 - undecanetiol.

LOD Limite de detección (*Limit of detection*)

LOD Limite de cuantificación (*Limit of quantification*)

NHS N-hidroxisuccinimida.

PCTXL Paclitaxel

SAM Monocapas autoensamblada (*Self Assembled Monolayer*).

STM Escaneo por microscopía electrónico (*Scanning tunneling microscopy*).

RESUMEN

TÍTULO: ESPECTROSCOPIA DE CAPACITANCIA ELECTROQUÍMICA EN LA DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA AFINIDAD DE INTERACCIÓN DE FÁRMACOS ANTI-MITÓTICOS CON β -TUBULINA 

AUTOR: SANDRA PATRICIA CORZO MANTILLA 

PALABRAS CLAVE: MONOCAPAS, DUREZA QUÍMICA, SENSORES, ANTIMITÓTICOS.

DESCRIPCIÓN: Se diseñó, implementó y evaluó un sensor para cuantificar la interacción de fármacos antimitóticos con β -Tubulina, basado en la determinación experimental de la dureza química por Espectroscopia de Capacitancia Electroquímica (ECE).

El sensor desarrollado utiliza como receptor β -Tubulina inmovilizada en una monocapa mixta de 11-ferrocenil-1-undecanotiol y ácido 16-Mercaptohexadecanoico autoensamblada sobre un sustrato de oro, el cual funciona como electrodo de trabajo en una celda electroquímica de tres puntas, junto con un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$ 3 [M] y un contraelectrodo de platino. La evaluación del sensor se llevó a cabo midiendo el espectro de capacitancia electroquímica con diferentes concentraciones de tres fármacos antimitóticos ampliamente utilizados en el tratamiento de cáncer: Paclitaxel, Docetaxel y Epotilona B. La dureza química se obtuvo como el inverso de la distancia entre los cortes con las abscisas de las gráficas de Nyquist de capacitancia. Los datos obtenidos se parametrizaron, graficaron y analizaron por medio de algoritmos desarrollados en lenguaje Python y organizados en un Jupyter Notebook. Se calibró el sensor por medio de curvas analíticas construidas por dos métodos diferentes, para el primero se utilizó la dureza química y para el segundo, se definió la dureza química efectiva, con la cual, se logró reducir la dependencia de la medida del sensor de las condiciones de la superficie de interacción, mejorando su capacidad de detección. Se estimó la afinidad β -Tubulina - fármaco por medio de las isotermas de Freundlich. Los valores obtenidos para la constante de Freundlich están en el rango $28.20 [nM] \leq K_f \leq 57.93 [nM]$. Se obtuvieron límites de detección LOD y cuantificación LOQ menores a 30 [nM] y 97 [nM] respectivamente.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: David Alejandro Miranda Mercado PhD, Paulo Roberto Bueno PhD

ABSTRACT

TITLE: ELECTROCHEMICAL CAPACITANCE SPECTROSCOPY IN THE EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE BINDING AFFINITY OF ANTI-MITOTIC DRUGS FOR β -TUBULIN 

AUTHOR: SANDRA PATRICIA CORZO MANTILLA 

KEYWORDS: SELF ASSEMBLED MONOLAYERS, CHEMICAL HARDNESS, SENSORS, ANTIMITOTICS, β -TUBULIN.

DESCRIPTION:

A biosensor to quantify the binding affinity of antimitotic drugs for β - Tubulin based on the experimental determination of chemical hardness by Electrochemical Capacitance Spectroscopy was designed, implemented, and evaluated. The biosensor developed uses as receptor β -Tubulin immobilized in a mixed self-assembled monolayer of 11-ferrocenyl-1-undecanethiol and 16-mercaptohexadecanoic acid on a gold substrate, which works like working electrode into an electrochemical cell of three points, with a reference electrode of $Ag/AgCl$ 3 [M] and a platinum counter electrode. The biosensor was evaluated by measuring the electrochemical capacitance spectra of different concentrations of three antimitotic drugs widely used in cancer treatment: Paclitaxel, Docetaxel, and Etoposide B. The chemical hardness was obtained as the inverse of the distance between cutting points with the abscissas of the capacitance Nyquist plot. Data was parametrized, plotted, and analyzed by using Python algorithms developed and organized into a Jupyter Notebook. The biosensor was calibrated by analytic curves done by two different methods, the first using the chemical hardness; for the second, the effective chemical hardness was defined, and, with this, the measurement dependence on the interaction surface was reduced, improving the biosensor detection ability. The binding affinity of the drug for β -Tubulin was estimated using the Freundlich isotherms. The Freundlich constant obtained for the three drugs is between the range $28.20[nM] \leq K_f \leq 57.93[nM]$. The limit of Detection and Limit of Quantification for the three drugs are less than 30 [nM] and 97 [nM] respectively.

* Doctoral Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directors: David Alejandro Miranda Mercado PhD, Paulo Roberto Bueno PhD

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades causadas por factores genéticos y epigenéticos que alteran la proliferación celular. Sus altas tasas de incidencia y mortalidad han hecho que se le considere uno de los mayores problemas de salud pública enfrentados por la humanidad ¹. Para hacerse una idea, se estima que durante el 2020, la pandemia del SARS-CoV-2 (COVID-19) ocasionó 1.82 millones de muertes en el mundo ³, mientras que por cáncer murieron alrededor de 10 millones de personas el mismo año ⁴. Existen diferentes métodos para el tratamiento del cáncer, uno de los más utilizados es la quimioterapia, o uso de fármacos que, o bien, destruyen las células cancerígenas, o detienen su crecimiento. Sin embargo, la capacidad de mutación de estas células les permite crear resistencia a los fármacos, convirtiendo en un reto la búsqueda de agentes anticancerígenos y el diseño de nuevos tratamientos cada vez más efectivos ⁵.

La identificación de moléculas con actividad anticancerígena es la primera fase de un largo proceso para la obtención de posibles fármacos, de los cuales solo el 5 %

¹ IRENE FOSTER. "Cancer: A cell cycle defect". En: *Radiography* 14.2 (2008), págs. 144-149.

² FREDDIE BRAY y col. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". En: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68.6 (2018), págs. 394-424.

³ MICHAEL S.C. THOMAS y CATHY ROGERS. "Education, the science of learning, and the COVID-19 crisis". En: *Prospects* 0123456789 (2020), págs. 1-4.

⁴ INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Cancer Tomorrow*. 2020.

⁵ MUTHU DHANDAPAN y AARON GOLDMAN. "Preclinical Cancer Models and Biomarkers for Drug Development: New Technologies and Emerging Tools". En: *J Mol Biomark Diagn* 8.5 (2017), págs. 1-8.

llega a la fase clínica; en este sentido, se hace necesaria la implementación de nuevas técnicas que permitan optimizar el tamizaje de dichas moléculas^[5]. Un método para evaluar la actividad anticancerígena consiste en comparar la afinidad de interacción de diferentes moléculas por una diana farmacológica conocida; una alta afinidad supone mayor eficiencia y menos efectos colaterales^[6]. Por ejemplo, desde que se conoció la actividad antitumoral del paclitaxel y en 1967 se logró extraer su principio activo de la corteza del tejo del pacífico, se han llevado a cabo diversos trabajos en la búsqueda de nuevas moléculas naturales y artificiales que permitan la obtención de fármacos cuyo mecanismo de acción sea similar al del paclitaxel, estos son los denominados fármacos taxanos. La diana farmacológica de los taxanos es la β -Tubulina; por medio de esta, se unen a los microtúbulos y los hiperestabilizan deteniendo su proceso de despolimerización, como resultado se bloquea la división celular durante la metafase, y así, se inhibe la proliferación celular y se induce apoptosis celular^[7].

Debido a su éxito en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, el descubrimiento de los fármacos taxanos se considera uno de los mayores avances de la quimioterapia^[8]. Lo que hace que sea de especial interés desarrollar técnicas que permitan cuantificar la interacción de diferentes moléculas y complejos con la β -Tubulina, para implementarlas como pretamizaje de nuevos fármacos taxanos.

⁶ ATTA-UR-RAHMAN, M.I. CHOUDHARY y W.J THOMSEN. *Bioassay Techniques for Drug Development*. 1.^a ed. CRC Press, 2001.

⁷ MARY ANN JORDAN y LESLIE WILSON. "Microtubules as a target for anticancer drugs". En: *Nature Reviews Cancer* 4.4 (2004), págs. 253-265.

⁸ JIE JACK LI. *Top Drugs: Their History, Pharmacology, and Syntheses*. New York: Oxford University Press, 2015.

Los biosensores son de gran utilidad para traducir fenómenos biológicos en señales fisicoquímicas y pueden ser adaptados para su uso en el tamizaje de fármacos taxanos. En un biosensor se hace interactuar un analito con un receptor. La unión entre un analito y su receptor está gobernada por procesos de polarización y fuerzas de tipo electrostático asociadas a los diferentes enlaces químicos, de manera que la interacción entre la β -Tubulina y las moléculas a estudiar puede ser detectada a partir de cambios en las propiedades eléctricas y electrónicas del sistema^{9,10}.

Por otro lado, recientemente se ha reportado que las medidas de espectroscopia de capacitancia electroquímica (ECE) de monocapas moleculares con sondas redox confinadas, pueden ser interpretadas desde el marco conceptual de la teoría del funcional de densidad (DFT) y permite obtener experimentalmente información acerca de la dureza química del sistema¹¹. La dureza química es un índice de reactividad ligado a la densidad electrónica y por tanto altamente sensible a los cambios ambientales del sistema¹², que puede ser utilizado para cuantificar interacción de un receptores anclados en la monocapa con sus respectivos analitos.

El objetivo principal planteado para esta investigación fue diseñar un biosensor basado en espectroscopia de capacitancia electroquímica para cuantificar la interac-

⁹ EDWARD C. HULME y MIKE A. TREVETHICK. "Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation". En: *British Journal of Pharmacology* 161.6 (2010), págs. 1219-1237.

¹⁰ T. KENAKIN. *A Pharmacology Primer: Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery*. Elsevier Science, 2018.

¹¹ DAVID A. MIRANDA y PAULO R. BUENO. "Density functional theory and an experimentally-designed energy functional of electron density". En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18.37 (2016), págs. 25984-25992.

¹² GUY MAKOV. "Chemical Hardness in Density Functional Theory". En: *The Journal of Physical Chemistry* 99.23 (1995), págs. 9337-9339. DOI: [10.1021/j100023a006](https://doi.org/10.1021/j100023a006).

ción de fármacos antimitóticos con β -Tubulina. Con este fin, se implementó un sistema para medir el espectro de capacitancia electroquímica de β -Tubulina interactuando con diferentes concentraciones de fármacos taxanos.

La investigación se dividió en tres partes: primero, la obtención de la superficie de interacción; segundo, la funcionalización y evaluación del sensor y tercero, el análisis de la interacción de los fármacos estudiados con la β -Tubulina. La descripción de cada una de estas partes incluye fundamentos teóricos, procedimientos y resultados, y se presenta en cada uno de los capítulos: superficie de interacción, capítulo (1); funcionalización y evaluación del sensor, capítulo (2); interacción β -Tubulina - fármaco, capítulo (3), y finalmente, en el capítulo (4) se presentan las conclusiones del trabajo.

1. SUPERFICIE DE INTERACCIÓN

Los sensores son dispositivos analíticos que incorporan material biológico a un micro-sistema de transducción fisicoquímico. De acuerdo con su sistema de transducción, se clasifican en opto-electrónicos, bioluminiscentes, piezoeléctricos, termistores, o electroquímicos. Estos últimos, sobresalen por su capacidad de convertir eventos biológicos en señales eléctricas sin requerir ningún tipo de marcaje de las especies en estudio ¹³.

La sensibilidad de un sensor electroquímico está altamente influenciada por las propiedades de la superficie en la que la muestra entra en contacto con el receptor, en general, la muestra está conformada por diferentes moléculas entre las que se puede encontrar el analito específico que se une al receptor. Si las moléculas no específicas se adsorben sobre la superficie sólida del transductor afectarán negativamente la calidad de la señal ¹⁴.

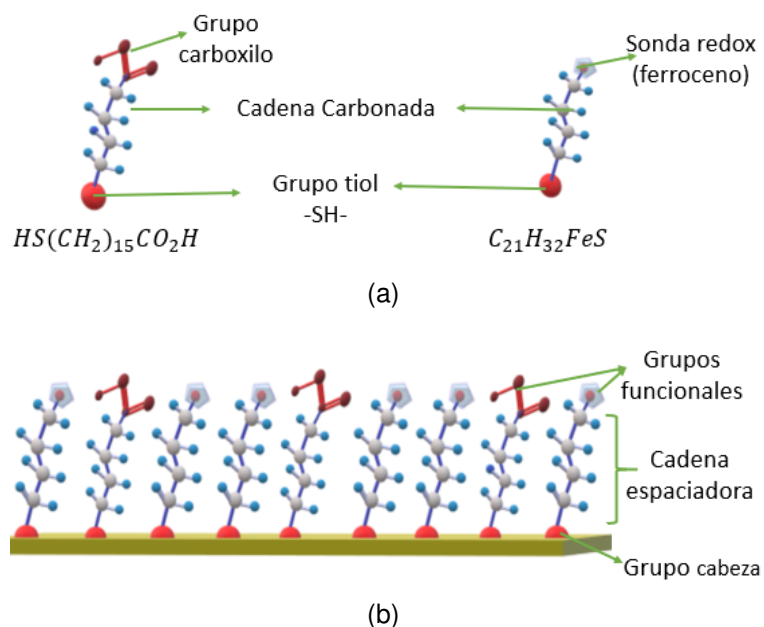
Se han desarrollado múltiples técnicas de ingeniería de superficies para optimizar la señal de transducción, una de ellas es el uso de monocapas autoensambladas (SAM's), estructuras orgánicas altamente organizadas, formadas por la quimisorción espontánea de moléculas sobre una superficie ¹⁵. Este método es ampliamente uti-

¹³ PIYUSH PARKHEY y S. VENKATA MOHAN. *Biosensing applications of microbial fuel cell: Approach toward miniaturization*. Elsevier B.V., 2018, págs. 977-997.

¹⁴ MANDEEP SINGH, NAVPREET KAUR y ELISABETTA COMINI. "The role of self-assembled monolayers in electronic devices". En: *Journal of Materials Chemistry C* 8.12 (2020), págs. 3938-3955.

¹⁵ A. J. MUSCAT. *Self-assembly of functionalized organic molecules on flat solid surfaces*. Elsevier, 2018, págs. 810-816.

Figura 1. a. Representación de las moléculas 16-MHDA y FcC11 utilizadas en la construcción de la SAM. b. Representación ideal de una SAM mixta de 16-MHDA y FcC11.



lizado en el desarrollo de sensores debido a su versatilidad, a que facilitan el anclaje de receptores específicos y el bloqueo de sitios no específicos y emulan el proceso natural de reconocimiento molecular¹⁶.

En este trabajo se utilizó una SAM mixta de 11-ferrocenil-1-undecanotiol (FcC11) y ácido 16 Mercaptohexadecanoico (16-MHDA) ensamblada sobre un sustrato de oro. Estas moléculas están conformadas por un grupo tiol, una cadena carbonada y un grupo funcional (figura 1.a). Los grupos tiol presentan alta afinidad por el oro, con el

¹⁶ SILVIA FERRETTI y col. "Self-assembled monolayers: A versatile tool for the formulation of bio-surfaces". En: *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 19.9 (2000), págs. 530-540.

que forman una unión fuerte dando estabilidad a la molécula¹⁷¹⁸. La cadena carbonada favorece el ensamblaje organizado por medio de fuerzas de Van der Waals y funciona como espaciador, garantizando que el grupo funcional mantenga una distancia fija respecto al sustrato¹⁹. El grupo carboxilo del 16-MHDA facilita el anclaje de la proteína que se utiliza como receptor, mientras que el ferroceno del FcC11, funciona como una sonda redox atada a la superficie, dado que puede intercambiar un electrón con el sustrato de oro, al aplicar una corriente externa al sistema, ocurrirán procesos reversibles de oxidación-reducción en la superficie²⁰²¹. La figura 1.b, es una representación ideal de la SAM implementada.

1.1. OBTENCIÓN DE LA SUPERFICIE DE INTERACCIÓN

En esta fase se buscó obtener SAM's con alta densidad de empaquetamiento, estabilidad y reproducibilidad, estos factores son influenciados por el tipo de disolvente utilizado, la temperatura, el tiempo de formación y las propiedades superficiales del sustrato. El disolvente más utilizado debido a su naturaleza polar es el etanol. El

¹⁷ THOMAS BÜRGI. "Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters". En: *Nanoscale* 7.38 (2015), págs. 15553-15567.

¹⁸ PETER MAKSYMOWYCH y col. "Gold adatom as a key structural component in self-assembled monolayers of organosulfur molecules on Au(1 1 1)". En: *Progress in Surface Science* 85.5-8 (2010), págs. 206-240.

¹⁹ R. COLORADO y T.R. LEE. "Thiol-based Self-assembled Monolayers: Formation and Organization". En: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Ed. por K.H. Jürgen Buschow y col. Oxford: Elsevier, 2001, págs. 9332 -9344.

²⁰ LARRY R. FAULKNER ALLEN J. BARD. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. second. New York: JOHN WILEY & SONS, INC., 2000, págs. 368-414.

²¹ NAOYUKI HIRATA y col. "Excited electron dynamics at ferrocene-terminated self-assembled monolayers on Au(1 1 1): Lengthened lifetime of image potential state". En: *Chemical Physics Letters* 561-562 (2013), págs. 131-136.

tiempo de formación varía entre 12 y 24 horas, aunque la unión de los tioles al oro solo toma unos minutos, el tiempo restante es requerido para que las cadenas carbonadas se direccionen por medio de interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno hasta alcanzar un empaquetamiento compacto y mayor estabilidad ¹⁹.

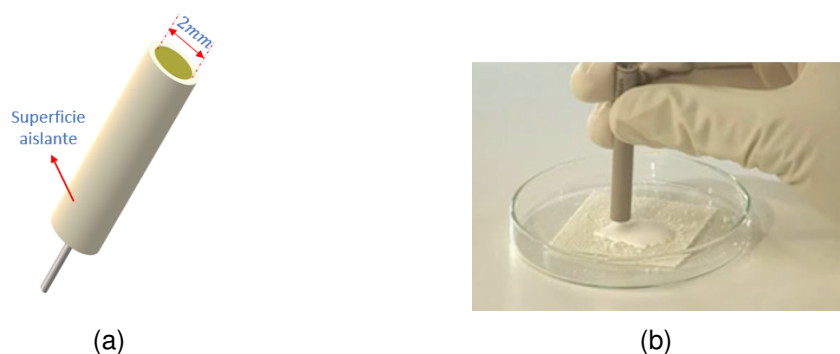
Es importante reducir a un mínimo la cantidad de imperfecciones del sustrato, tales como defectos de grano, rugosidad y la presencia de moléculas absorbidas del ambiente, los métodos a utilizar para lograr esto varían de acuerdo con el material y geometría del sustrato a utilizar, en este caso se utilizó oro sólido en forma cilíndrica y se realizó pulido mecánico acompañado de limpieza electroquímica. La rugosidad del sustrato también se puede estimar por medios electroquímicos, que permiten calcular el área electro-activa y compararla con el área geométrica ²². Una vez el sustrato se encuentra en condiciones apropiadas, basta exponerlo a una solución que contenga las moléculas a ensamblar durante un tiempo determinado para obtener la monocapa.

A continuación, se describe detalladamente el procedimiento que se siguió tanto en el pretratamiento como en la formación de la SAM:

1.1.1. Pretratamiento del electrodo de oro Como sustrato para el ensamblaje de la SAM se utilizó un electrodo de disco rotatorio de oro, de 2 [mm] de diámetro, marca Metrohm (figura 2.a). El electrodo fue sometido a pulido mecánico con óxido de aluminio de tamaño de grano decreciente de 1 [μm], 0.3 [μm] y 0.05 [μm], intercalados con sonicación en agua Milli-Q tipo I, durante 2 minutos (figura 2.b). Una

²² TIAGO A. BENITES; WILLIAN C. RIBEIRO; MÁRCIO S. GÓES; ANTONIO A. P. FERREIRAI; PAULO R. BUENO. "Efeitos da Rugosidade Superficial nas Propriedades de Passivação de Monocamadas Orgânicas Automontadas". En: *Quim. Nova* 37.9 (2014), págs. 1533-1537.

Figura 2. a. Electrodo de disco rotatorio de Metrohm Autolab. El electrodo está conformado por una barra de oro recubierta de un material aislante, de manera que solo queda expuesta su área transversa, un disco de 2mm de diámetro b. Pulido mecánico con óxido de aluminio



vez obtenido un acabado tipo espejo, se procedió a realizar 60 ciclos de desorción electroquímica en $NaOH$ 0.5 [M] en una ventana de potencial de -1.5 [V] a -0.5 [V] con una velocidad de barrido $100[mV/s]$, seguida de 50 ciclos de Voltamperometría cíclica (CV) en H_2SO_4 0.5 M saturada con nitrógeno, entre -0.2 [V] y 1.5 [V] a 100 [mV/s].

Finalmente se calculó el factor de rugosidad, f_r , como el cociente entre el área real, A_r y el área geométrica, A_g ; $f_r = \frac{A_r}{A_g}$. Donde A_r es el valor obtenido al integrar el pico catódico del último ciclo de la CV en H_2SO_4 , dividido en la constante de conductividad del oro $c = 410 [\frac{\mu C}{cm^2}]$ ²³:

$$A_r = \frac{1}{cv} \int_{t_i}^{t_f} IdE \quad (1)$$

²³ FLÁVIO C.B. FERNANDES y col. "Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures". En: *Biosensors and Bioelectronics* 57 (2014), págs. 96-102.

Donde $v = \frac{dE}{dt}$ es la velocidad de barrido y E el potencial variable en el tiempo²²²⁴.

1.1.2. Obtención de la Monocapa Autoensamblada (SAM) Mixta Para la construcción de la SAM se indujo quimisorción de moléculas tioladas (moléculas que contienen un grupo tiol (-SH)) sobre el oro, por inmersión de la superficie pretratada en una solución de FcC11 y 16-MHDA (9 : 1) en etanol, durante 16 horas a temperatura ambiente ($\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente se retiró el electrodo de la solución, se lavó con etanol y agua Milli-Q tipo I y se secó con gas de nitrógeno.

Una vez obtenida la SAM, se estudió su comportamiento electroquímico por CV en Perclorato de tetrabutilamonio ($TBAClO_4$) 20 [mM] disuelto en acetonitrilo y H_2O en una relación 20:80. Se realizaron 10 ciclos de CV con velocidad de barrido 100 [mV/s] entre -0.1 [V] y 0.5 [V] .

Con el último pico de CV se calculó el potencial de media onda $E_{1/2}$, como el valor medio entre los potenciales correspondientes al pico anódico E_{pa} y al pico catódico E_{pc} :

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2)$$

Posteriormente se utilizará este valor para las medidas de ECE.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las mayores dificultades experimentales que se presentó durante el desarrollo del sensor fue la obtención de superficies de interacción altamente reproducibles,

²⁴ S. TRASATTI y O. A. PETRII. "Real surface area measurements in electrochemistry". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 327.1-2 (1992), págs. 353-376.

este es uno de los obstáculos más comunes en la fabricación de diferentes sistemas de detección de interacción entre un analito y su receptor específico²⁵. Las condiciones superficiales del sustrato son clave, pero no la única condición, para obtener una superficie de interacción reproducible, por esta razón cuando los electrodos no mostraron condiciones apropiadas después del pretratamiento, este se repitió hasta que se obtuvieron condiciones satisfactorias.

Una vez ancladas las moléculas sobre la superficie de oro, se evaluó su comportamiento por técnicas electroquímicas, el comportamiento electroquímico de este tipo de SAM's es bien conocido, todas las SAM's que no presentaron el comportamiento esperado fueron descartadas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el pretratamiento del sustrato de oro y la formación de la SAM y se describen los criterios de evaluación que se tuvieron en cuenta:

1.2.1. Electroodos Pre-tratados La selección de los sustratos de oro para la formación de las SAM's se llevó a cabo de acuerdo a dos criterios: Primero, se verificó que la curva obtenida en el último ciclo de la CV descrita en la sección (1.1.1), coincidiera con el perfil del oro policristalino en H_2SO_4 , 0.5 [M] reportado en la literatura. La curva de la figura 3, es un ejemplo de los voltamperogramas obtenidos de electrodos cuya superficie se consideró óptima para la formación de la SAM. En ella se pueden identificar tres regiones características. La primera se conoce como zona capacitiva y en la figura 3 se observa entre 0 [V] y ~ 0.75 [V]. En este tramo se espera que la respuesta de la corriente al potencial variando en sentido positivo

²⁵ FELIPE F. HUDARI y col. "Reagentless Detection of Low-Molecular-Weight Triamterene Using Self-Doped TiO₂ Nanotubes". En: *Analytical Chemistry* 90.12 (2018), págs. 7651-7658.

tenga simetría especular con la correspondiente respuesta a la variación del potencial en sentido negativo, lo contrario indicaría que durante el proceso la superficie está sufriendo cambios que afectan su naturaleza, por ejemplo, por deposición de especies disueltas en la solución ²⁶. La adsorción de diferentes especies sobre la superficie de oro se verá reflejada en cambios en esta región, la presencia de picos y el aumento significativo del área encerrada por la curva indican que la superficie no se ha limpiado adecuadamente para la formación de la SAM.

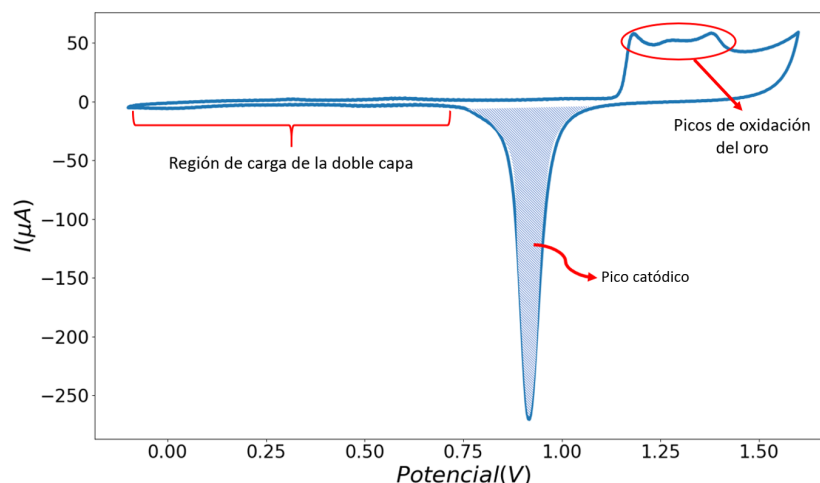
Las siguientes regiones corresponden a los procesos de oxido-reducción. En respuesta a la variación del potencial, circula una corriente faradaica sobre la superficie, una monocapa de óxidos se forma y se remueve en cada ciclo ²⁷. Aproximadamente entre 1.20 [V] y 1.50 [V], se encuentran los picos de oxidación del oro, como el electrodo es de oro policristalino se identifican los picos correspondientes a las superficies (100), (110) y (111). Si sobre la superficie hay especies adsorbidas, por ejemplo, del ambiente, se puede dificultar diferenciar estos picos o pueden aparecer nuevos. El pico catódico o de reducción de óxidos de oro se observa cerca de 0.9 [V], esta región está relacionada con el desgaste del electrodo, y es utilizada para calcular el área real de la superficie. La presencia de rugosidades y defectos sobre la superficie del electrodo se verá reflejada en un pico catódico muy pronunciado.

El segundo criterio fue el factor de rugosidad f_r , en el cálculo de este parámetro se asume que el oxígeno forma una monocapa sobre la superficie de oro, de manera que la relación de átomos de oxígeno con átomos de oro es 1:1, bajo este razona-

²⁶ XINGXING XU y col. "Revisiting the factors influencing gold electrodes prepared using cyclic voltammetry". En: *Sensors and Actuators, B: Chemical* 283 (2019), págs. 146-153.

²⁷ A. HAMELIN y A. M. MARTINS. "Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 2. Behaviour of high-index faces". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 407.1-2 (1996), págs. 13-21.

Figura 3. Voltamperograma de un electrodo de Au en una solución 0.5 M de H_2SO_4 saturada con N_2 a 100 mV/s . La región sombreada representa la reducción de óxidos de oro y es la utilizada para calcular el área real del electrodo.



miento el área encerrada por el pico de reducción de óxido de oro está directamente relacionado con el área electro-activa ó área real del electrodo, que dividida en el área geométrica proporciona el factor de rugosidad. A pesar de las aproximaciones necesarias, se ha mostrado que la rugosidad calculada por este método es comparable con la obtenida por métodos físicos como el escaneo por microscopía de efecto túnel (STM), con la ventaja de presentar resultados en tiempo real y de no requerir una geometría específica de muestra ²⁴. Mientras mas cercano sea f_r a la unidad, mas parecido es el valor del área real al área geométrica, indicando menor rugosidad. En este caso, se seleccionaron como óptimos todos los electrodos con $f_r \leq 1.4$.

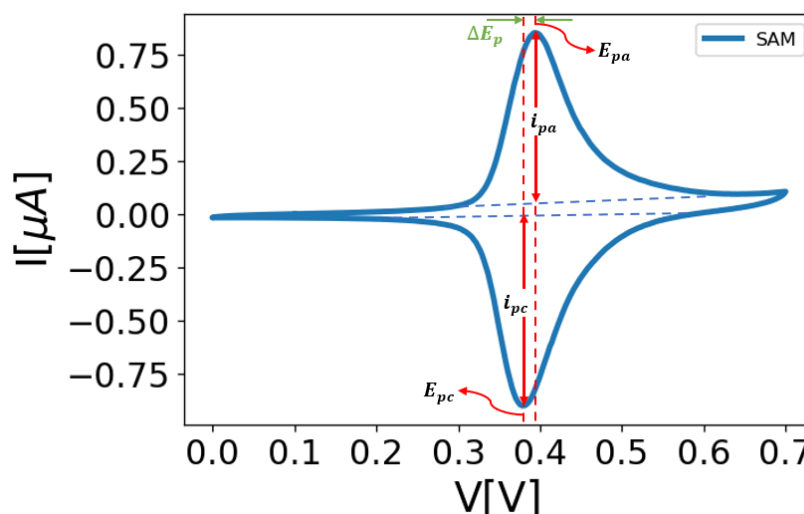
Además de las especies adsorbidas del ambiente, las alteraciones en el área capacitiva o en los picos de oxidación se pueden atribuir a la fuga de iones de cloro del electrodo de referencia, así como a la deposición de iones de platino del contraelectrodo. Estos iones, se disuelven en la solución y pueden formar complejos

que terminan por depositarse en la superficie alterando su estructura²⁷. Durante los experimentos fueron muy pocos los casos en que se debió repetir la limpieza de los electrodos por este tipo de alteraciones, de lo cual, se puede deducir que la presencia de especies adsorbidas del ambiente o de la solución fue escasa. Sin embargo, aunque la mayoría de los voltamperogramas coincidieron con el perfil indicado, en muchos de los casos el pico de reducción alcanzó valores absolutos de corriente superiores a $300 [\mu A]$, evidenciado alta rugosidad del electrodo, la cual, se confirmó al calcular valores de $f_r > 1.4$. Estos valores se pueden asociar tanto a fallas durante el proceso de pulido mecánico, que representa una de las mayores dificultades en la obtención de superficies reproducibles, como al desgaste sufrido por el electrodo durante la CV.

En general, obtener el perfil del oro y los factores de rugosidad aceptables, siguiendo el proceso descrito en la sección (1.1.1), fue más sencillo durante los primeros experimentos, es decir, cuando los electrodos tenían poco uso. Sin embargo, tras someter los electrodos a sucesivas limpiezas, después de varios experimentos, se evidenció el desgaste de la superficie de oro reflejado en un mayor grado de dificultad para obtener valores de rugosidad aceptables. En los últimos experimentos realizados, correspondientes a Docetaxel, el mejor factor de rugosidad obtenido fue de $f_r = 1.4$, en contraste con los primeros experimentos (correspondientes a Eptilona B) en los que este parámetro osciló en el rango $1.1 \leq f_r \leq 1.2$.

1.2.2. Monocapa Autoensamblada Mixta Las curvas voltamperométricas permiten verificar el correcto anclaje de las moléculas al sustrato de Au. En el caso de una SAM mixta de FcC11 y 16-MHDA (9 : 1), las CV's se caracterizan por la presen-

Figura 4. Curva de CV obtenida para una SAM mixta de FcC11 y 16-MHDA (9:1) en $TBAClO_4$ 20 mM, con velocidad de barrido 100 mV/s.



cia de picos de reducción y oxidación debidos a los de ferrocenos del FcC11 ²⁸. La densidad de empaquetamiento y estructura organizada de la SAM se evidencia en la simetría de la curva, un voltamperograma carente de simetría indica un anclaje poco organizado de las moléculas. Adicionalmente, la diferencia entre el voltaje del pico anódico y el catódico ΔE_p debe ser menor a 60 [mV], si la superficie tiene un comportamiento reversible.

Aunque la CV no es una técnica ideal para cuantificar la concentración de especies, la corriente de pico puede asociarse con la densidad superficial de moléculas de FcC11 ^{20 28}. En este caso, la corriente de pico fue muy variable de una monocalpa a otra y en algunos casos muy inestable. Para continuar los experimentos, se

²⁸ ADRIANO SANTOS y PAULO R. BUENO. "Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface". En: *Biosens. Bioelectron.* 83 (2016), págs. 368-378.

seleccionaron las SAM's que presentaron valores de corriente de pico desde 0,42 [μA] hasta 1,5 [μA]. El potencial de media onda osciló entre 0,35 [V] y 0,4 [V] para todas las SAM's seleccionadas. Se descartaron las SAM's cuya corriente de pico no superó 0,4 [μA], las que no presentaron estabilidad después del séptimo ciclo de CV y las que presentaron un $\Delta E_p > 60$ [mV] debido a que estos son indicadores de un anclaje de moléculas muy pobre o poco organizado.

En la literatura se ha reportado que las SAM's de moléculas tioladas cuentan con alta estabilidad y son fáciles de obtener. Sin embargo, también se sabe que las SAM's que contienen moléculas con grupos terminales pesados, como el ferroceno, tienen un menor grado de organización en su estructura, menor densidad de empaquetamiento y se ha reportado que este tipo de moléculas tiende a formar múltiples capas 21.

En esta etapa se presentaron grandes dificultades con la obtención de monocapas estables y reproducibles, alrededor del 40 % de las SAM fabricadas se debieron descartar, en su mayoría por presentar corrientes de pico muy bajas o inestables. Teniendo en cuenta que para la quimisorción de las moléculas solo se utilizaron sustratos que presentaran condiciones óptimas, la dificultad para obtener la SAM mixta con alta reproducibilidad se atribuyó al comportamiento intrínseco de las moléculas utilizadas, esto evidencia la necesidad de estudiar otros tipos de superficies que permitan alta sensibilidad como lo hacen las SAM's con sondas redox ancladas, pero que cuenten con mayor reproducibilidad .

2. FUNCIONALIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL BIOSENSOR

Uno de los componentes más importantes de un biosensor es el elemento de reconocimiento o receptor, encargado de reconocer al analito de interés; su selección depende de las aplicaciones que tendrá el biosensor. En este caso, se utilizó β -Tubulina, una proteína que junto con la α -Tubulina forma heterodímeros complejos. De la polimerización de varios heterodímeros de α β -Tubulina resultan largos filamentos proteicos tubulares denominados microtubulos. Los microtúbulos son parte esencial del citoesqueleto, una estructura encargada de dar forma y dinamismo a la célula. Los microtúbulos tienen la capacidad de aumentar y reducir su tamaño por polimerización y despolimerización de heterodímeros de Tubulina. Esta habilidad juega papel muy importante en la división celular, durante la interfase los microtúbulos se desensamblan y se reorganizan para formar el uso celular que permite la separación de los cromosomas ⁷.

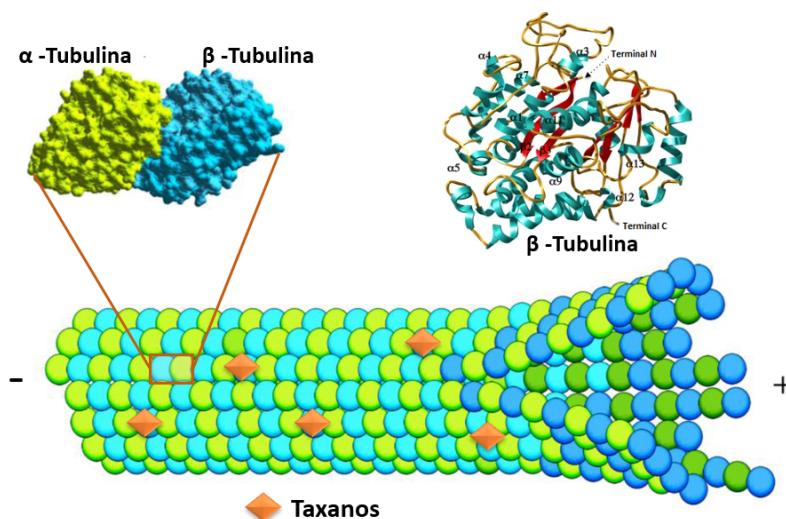
La β -Tubulina es la diana farmacológica de los taxanos, los cuales, al unirse a esta proteína, hiperestabilizan los microtúbulos, bloquean la división celular durante la metafase y como resultado inhiben la proliferación celular ²⁹. En la figura ⁵, se presenta un esquema de de los microtúbulos, y el punto de anclaje de los fármacos de tipo taxano ³⁰ ³¹.

²⁹ PHILIPPA CHEETHAM y DANIEL P. PETRYLAK. "Tubulin-targeted agents including docetaxel and cabazitaxel". En: *Cancer Journal (United States)* 19.1 (2013), págs. 59-65.

³⁰ FILIP BORYS y col. "Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting Microtubule Dynamics in Normal and Cancer Cells". En: *Molecules* 25.16 (2020).

³¹ DAVID VELA-CORCÍA y col. "Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance". En: *Scientific Reports* 8.1 (2018), pág. 7161.

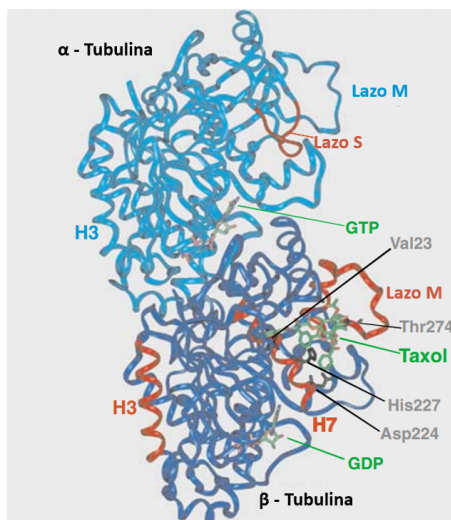
Figura 5. Esquema de la estructura de los microtúbulos formados por heterodímeros de tubulina. Se puede observar un modelo estructural de la β -Tubulina, diana farmacológica de los Taxanos.



El sitio de unión y el mecanismo de estabilización del taxol han sido tema de discusión en los últimos años, gran parte de los estudios sugieren que hay dos puntos principales de unión ambos en la β -tubulina: El primero localizado en la cara externa del microtúbulo, denominado poro tipo I, al cual, se une inicialmente el taxol para luego disociarse e ingresar al segundo sitio de unión, un bolsillo hidrofóbico en el lumen de los microtúbulos entre el dominio intermedio los aminoácidos 1-31 del terminal N y los residuos 217-233 de la β -tubulina, en contacto con el lazo M (Ver figura 6)³². Con este sitio interactúa principalmente el anillo taxano por formación

³² GEORGE A. ORR y col. "Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules". En: *Oncogene* 22:47 REV. ISS. 6 (2003), págs. 7280-7295.

Figura 6. Diagrama de cintas de la estructura de la $\alpha\beta$ -Tubulina y el sitio de unión del taxol. Tomado de Orr, George A. y col Licencia número 5096030417852



puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos ³³ ³⁴, de esta manera estabiliza al lazo M y favorece la polimerización ³⁵ ³⁶.

Otros agentes estabilizadores que presentan diferencias estructurales con el taxol, comparten con este el sitio de unión, un ejemplo son las epotilonas que compiten con el taxol para unirse a la β -tubulina, lo que indica que sus sitios de unión se su-

-
- ³³ ADWAIT R RANADE y col. "Characterizing the Epothilone Binding Site on β -Tubulin by Photoaffinity Labeling: Identification of β -Tubulin Peptides TARGSQY and TSRGSQQY as Targets of an Epothilone Photoprobe for Polymerized Tubulin". En: *J.Med Chem* 59.7 (2017), págs. 3499-3514.
- ³⁴ SUBRAMANI KARTHIKEYAN y col. "Exploring the Binding Interaction Mechanism of Taxol in β -Tubulin and Bovine Serum Albumin: A Biophysical Approach". En: *Molecular Pharmaceutics* 16.2 (2019), págs. 669-681.
- ³⁵ JESSICA J. FIELD, JOSÉ FERNANDO DÍAZ y JOHN H. MILLER. "The binding sites of microtubule-stabilizing agents". En: *Chemistry and Biology* 20.3 (2013), págs. 301-315.
- ³⁶ HOLLY FREEDMAN y col. "Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isotype binding selectivity". En: *Journal of Chemical Information and Modeling* 49.2 (2009), págs. 424-436.

perponen. Las epotilonas forman puentes de hidrógeno e interacciones polares con residuos aminoácidos del sitio de unión del taxol que son claves en la interacción del taxol con la β -tubulina^{35 37}.

Uno de los métodos mas utilizados para funcionalizar las SAM's con el elemento de reconocimiento es la inmovilización covalente por medio de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N -hidroxisuccinimida), el EDC activa los grupos carboxilos de las moléculas en la SAM, para que formen un enlace covalente con los grupos $-NH_2$ del receptor, mientras que el NHS estabiliza al EDC dando mayor eficiencia a la reacción^{38 39}. Estudios teóricos predicen que los sitios de unión mas probables entre la β -Tubulina y los grupos carboxilos en la SAM son los aminoácidos *HIS405* y *GLU411*⁴⁰, cuya ubicación es opuesta al bucle *M*, reportado como el sitio de unión del taxol⁷, es decir, la inmovilización es tal, que el sitio de unión del taxol queda expuesto para interactuar con la muestra.

La superficie modificada y funcionalizada con el receptor específico integrada a un sistema de medición constituye el biosensor. Para garantizar el correcto funcionamiento de un biosensor se suele evaluar su respuesta utilizando muestras cuya

-
- ³⁷ JAMES H. NETTLES y col. "The binding mode of epothilone A on α,β -tubulin by electron crystallography". En: *Science* 305.5685 (2004), págs. 866-869.
- ³⁸ MARCEL J E FISCHER. "Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach." En: *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols* (2010), pág. 255.
- ³⁹ NIKIN PATEL y col. "Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers". En: *Langmuir* 13.24 (1997), págs. 6485-6490.
- ⁴⁰ BARTOSZ TRZASKOWSKI y col. "Modeling Tubulin at Interfaces. Immobilization of Microtubules on Self-Assembled Monolayers". En: *The Journal of Physical Chemistry B* 109.37 (2005), págs. 17734-17742.

afinidad de interacción por el receptor específico sea conocida. El biosensor desarrollado en este trabajo se basa en ECE, su respuesta mide los cambios en la capacitancia electroquímica o capacitancia redox, C_r , de una monocapa molecular autoensamblada sobre el electrodo de trabajo^{41,42}. C_r está asociada a procesos de oxidación-reducción de la superficie molecular, por tanto, para medirla se requiere la presencia de especies redox ancladas a la superficie, como es el caso de la SAM mixta descrita en el capítulo (1). Es importante notar que C_r no es una capacitancia electrostática clásica, sino que está ligada al potencial electroquímico y por tanto, depende de la densidad de estados,

$$C_r = -\frac{dQ}{dV} = Ae^2\Gamma \frac{df}{dE_f} \quad (3)$$

Donde e es la carga fundamental, n la densidad numérica de e^- , $Q = Ane$ es la carga total suministrada al sistema, Γ la cobertura superficial de moléculas redox, $f = \frac{n}{\Gamma}$ es la fracción de ocupación y E_f la energía de Fermi⁴³.

Para un nivel de energía C_r está dada por:

$$C_r = \frac{e^2\Gamma}{K_B T} f(1 - f) \quad (4)$$

Y es máxima para $f = \frac{1}{2}$ que corresponde al potencial de media onda $E_{\frac{1}{2}}$ ²³.

⁴¹ ADRIANO SANTOS y col. "Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity". En: *Biosensors and Bioelectronics* 62 (2014), págs. 102-105.

⁴² PAULO R. BUENO, GUSTAVO T. FELICIANO y JASON J. DAVIS. "Capacitance spectroscopy and density functional theory". En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17.14 (2015), págs. 9375-9382.

⁴³ PAULO R. BUENO, GIULIA MIZZON y JASON J. DAVIS. "Capacitance spectroscopy: A versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers". En: *Journal of Physical Chemistry B* 116.30 (2012), págs. 8822-8829.

Esta técnica cuenta con alta sensibilidad a la interacción de la SAM con su entorno, lo que la hace ideal para identificar y cuantificar interacción entre un receptor y su analito²³⁴⁴. Adicionalmente permite acceder a la dureza química del sistema¹¹, como se discutirá mas adelante.

Experimentalmente la ECE consiste en medir el espectro de impedancia electroquímica y calcular el espectro de capacitancia electroquímica. La impedancia $Z^*(\omega)$ y la capacitancia $C^*(\omega)$ son dos cantidades complejas que se relacionan por medio de la expresión:

$$C^*(\omega) = \frac{1}{j\omega Z^*(\omega)} \quad (5)$$

Donde $j = \sqrt{-1}$ y ω es la frecuencia angular. Las partes real e imaginaria se pueden resolver por análisis fasorial,

$$C' = \varphi Z'' \quad (6)$$

$$C'' = \varphi Z' \quad (7)$$

Siendo $\varphi = \frac{1}{\omega|Z|^2}$ ²³.

Para obtener la capacitancia redox son útiles los diagramas de Nyquist de capacitancia, gráficas de C'' Vs C' que se asemejan a un semicírculo, C_r se calcula como la distancia entre los cortes de dicho semicírculo con las abscisas y es inversamente proporcional a la concentración del analito⁴⁴.

⁴⁴ JOSHUA LEHR y col. "Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy". En: *Analytical Chemistry* 86.5 (2014), págs. 2559-2564.

2.1. INMOVILIZACIÓN DEL RECEPTOR Y MEDIDAS DE ECE

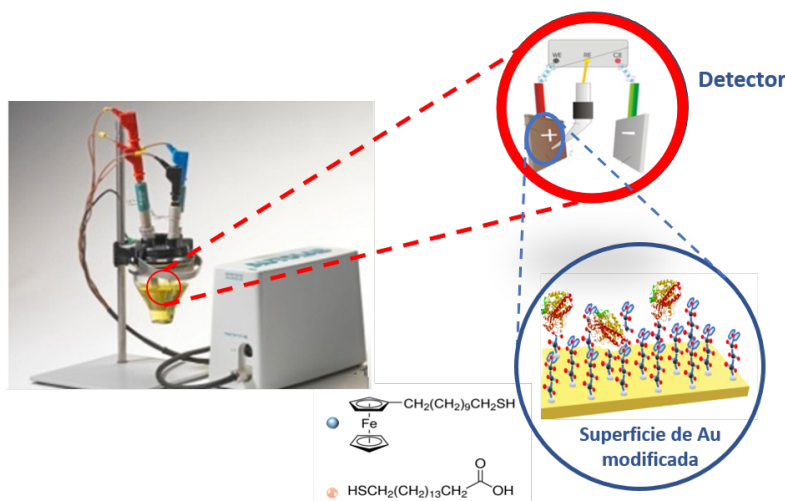
2.1.1. Inmovilización de β -Tubulina Para inmovilizar la β -Tubulina en la SAM, se activaron los grupos carboxilos del 16-MHDA incubando el electrodo en una solución acuosa de EDC-NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) 0.4[M] y N-Hidroxisuccinimida 0.1[M]) durante 30 minutos.

Cumplidos los 30 minutos se lavó la superficie con agua MilliQ tipo I, se secó con gas nitrógeno y se incubó durante 1 hora con una alícuota de 20 [μ L] de β -Tubulina 1 [μ M] en *Tris* – *HCl* pH 7.5. Finalmente, se lavó y secó nuevamente el electrodo y se bloquearon los sitios inespecíficos por inmersión de la superficie en etanolamina 1 [M].

2.1.2. Evaluación de respuesta del sensor por ECE El sistema de medición consiste en una celda electroquímica de tres puntas, en la que, la superficie de oro modificada y funcionalizada con β -Tubulina funciona como electrodo de trabajo. Como referencia se utilizó un electrodo de *Ag/AgCl* [3M] y como contra-electrodo un hilo de platino. Los electrodos fueron conectados a un potenciostato PGSTAT-204 de Metrohm - Autolab equipado con modulo FRA-32M y controlado por el software NOVA 1.11, por medio del cual se impone un potencial externo variable al sistema y se registra la corriente de respuesta para obtener el espectro de impedancia electroquímica compleja (Ver figura 7). Durante la medición se utilizó una jaula de Faraday para aislar la celda electroquímica y reducir el ruido externo. El sistema fue programado para calcular el espectro de capacitancia electroquímica utilizando las ecuaciones (5), (6) y (7).

Para evaluar la respuesta del sensor se utilizaron tres diferentes fármacos con actividad antimitótica conocida: Paclitaxel (PCTXL) $C_{47}H_{51}NO_{14}$, Docetaxcel (DCTXL)

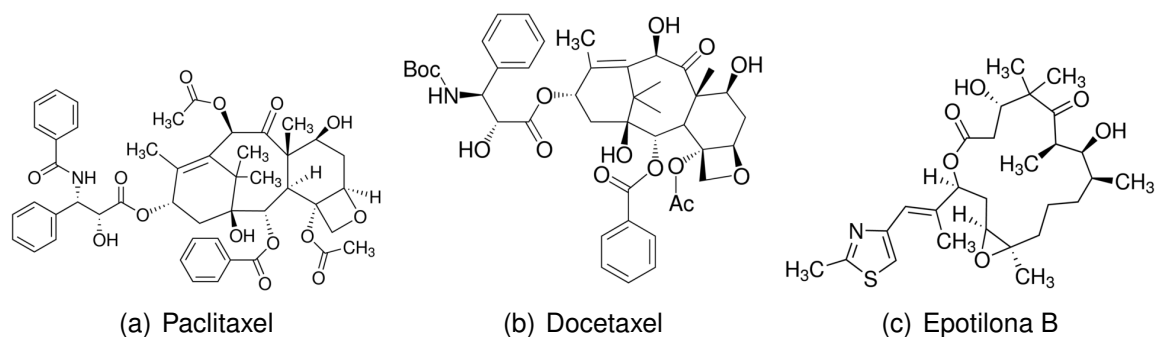
Figura 7. Esquema del sensor, sus componentes principales son un potenciostato PGSTAT-204, una celda electroquímica de tres puntas y una superficie de oro modificada que funciona como electrodo de trabajo.



$C_{43}H_{53}NO_{14}$ y Epotilona B (EPO B) $C_{27}H_{41}NO_6S$. La evaluación consistió en exponer el biosensor a diferentes concentraciones de cada uno de los fármacos y medir su espectro de capacitancia electroquímica alrededor del potencial de media onda $E_{1/2}$, para posteriormente obtener C_r .

Las diferentes concentraciones de fármaco se obtuvieron por dilución del mismo en

Figura 8. Estructura química de los fármacos utilizados en la evaluación del sensor. Los tres fármacos fueron adquiridos de Sigma Aldrich.



dimetilsulfóxido (DMSO) de grado de biología molecular. Los blancos corresponden a DMSO sin fármaco. En cada experimento se realizaron medidas de ECE de al menos 3 blancos, con el fin de estabilizar la respuesta que se tomó referencia para las siguientes medidas. La respuesta se considera estable si la variación entre los C_r obtenidos para los diferentes blancos es mucho menor que la variación entre las respuestas obtenidas para diferentes concentraciones de fármaco. Para cada medida se incubó la superficie modificada en 250 $[\mu L]$ de DMSO, durante 30 minutos. Cumplido el tiempo se realizaron 10 ciclos de CV en $TBAClO_4$ 20 $[mM]$ en una ventana de potencial de $-0.1 [V]$ a $0.7 [V]$. Con el voltamperograma del último ciclo de CV se determinó el potencial de media onda $E_{1/2}$ y alrededor de este se midieron 80 puntos de ECE en un rango de frecuencias entre 1 $[MHz]$ y 0.05 $[Hz]$ con un voltaje pico-pico de 10 $[mV]$. Todas las medidas se realizaron por triplicado

Después de las medidas de los blancos se procedió realizar las medidas con diferentes concentraciones de fármaco, para esto se incubó el electrodo durante 30 minutos en 20 $[\mu L]$ de la concentración mas baja de fármaco a utilizar. Cumplido el tiempo, se lavó el sensor con DMSO y agua Milli-Q, se secó con nitrógeno gaseoso y se procedió a realizar la CV y ECE siguiendo el mismo procedimiento descrito para los blancos. Cada medida se realizó por triplicado. Al finalizar las medias se lavó la superficie con DMSO y se secó con nitrógeno para iniciar nuevamente el proceso con la siguiente concentración de fármaco en orden ascendente. Este procedimiento se repitió hasta medir todas las concentraciones de fármaco a estudiar.

Se utilizaron concentraciones de fármaco comprendidas entre 0.1 $[\mu M]$ y 1000 $[\mu M]$ que corresponden a la menor concentración para la que se obtuvo una respuesta con diferencias significativas respecto de la respuesta del blanco y a la concentración de saturación del sistema respectivamente:

Paclitaxel: 0.1 $[\mu M]$, 5 $[\mu M]$, 10 $[\mu M]$, 20 $[\mu M]$, 50 $[\mu M]$ y 1000 $[\mu M]$.

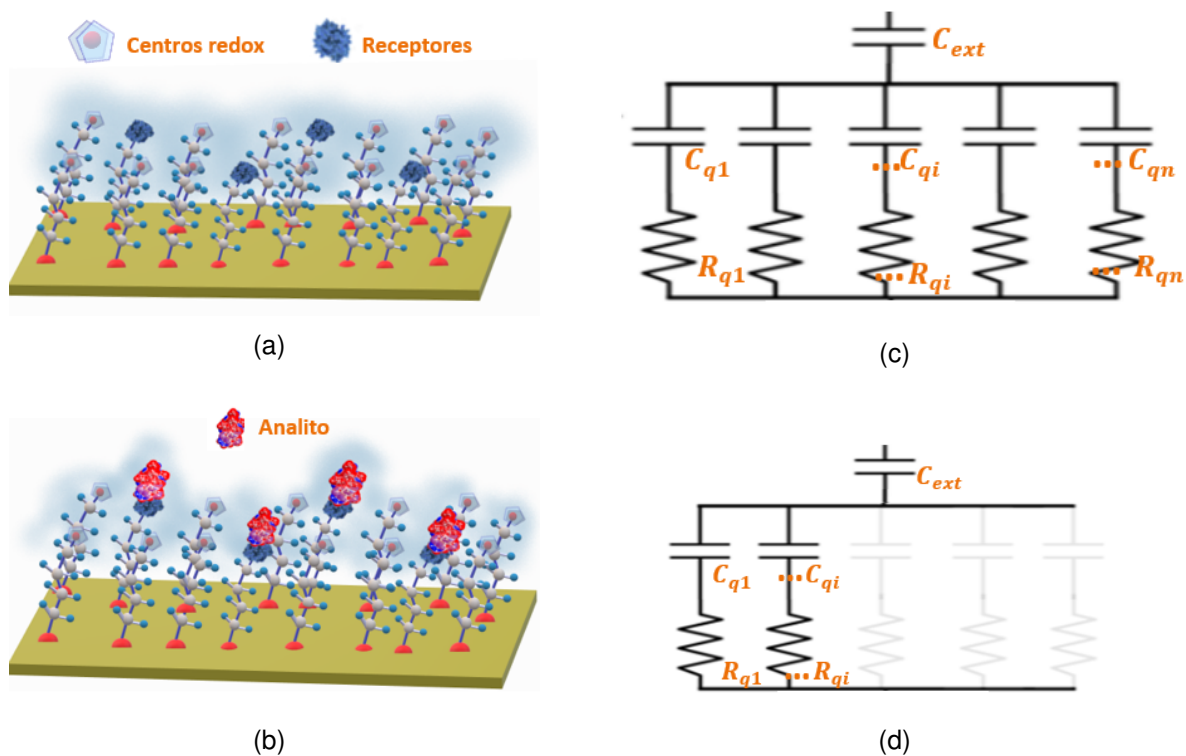
Docetaxel: 0.1 $[\mu M]$, 0.5 $[\mu M]$, 5 $[\mu M]$, 10 $[\mu M]$, 20 $[\mu M]$, 50 $[\mu M]$ y 1000 $[\mu M]$.

Epotilona B : 0.1 $[\mu M]$, 0.5 $[\mu M]$, 5 $[\mu M]$, 10 $[\mu M]$, 20 $[\mu M]$, 50 $[\mu M]$ y 1000 $[\mu M]$.

Al finalizar las mediciones con cada fármaco se realizaron 40 ciclos de CV en hidróxido de potasio (KOH) para retirar las SAM de la superficie de oro.

2.2. RESPUESTA DEL SENSOR POR ECE

Figura 9. Representación a. Sensor antes de interactuar con el fármaco, b. Circuito equivalente del sensor antes de interactuar con el fármaco c. Sensor después de interactuar con el fármaco d. Circuito equivalente, algunos centros redox inactivados por la interacción del fármaco con el sensor.



El espectro de capacitancia electroquímica de películas moleculares con sondas re-

dox confinadas, reporta información muy sensible al ambiente de los centros redox. Ilustrativamente, la SAM mixta puede verse como un circuito en el que todas las moléculas de FcC11 están conectadas en paralelo, y son representadas por un condensador (ferroceno) conectado en serie con una resistencia (cadena carbonada). De esta forma, la superficie de interacción puede ser modelada por un circuito como el que se presenta en la figura 9c, en el que C_{qi} , representa la capacitancia cuántica debida al i -ésimo centro redox, R_{qi} , la resistencia que opone el puente molecular al intercambio de electrones entre el i -ésimo centro redox y el sustrato de oro, C_{ext} , comprende todas las capacitancias no cuánticas en el sistema, como la capacitancia de la doble capa y la capacitancia debida a efectos de polarización sobre la SAM. La capacitancia redox C_r , y la resistencia R_q , son respectivamente la capacitancia y la resistencia equivalentes del sistema. C_q está relacionada con el potencial químico del sistema y no se puede estudiar como la capacitancia de un condensador convencional (Ver capítulo 3).

Diversos estudios indican que el evento de unión taxano- β -Tubulina se da por formación de puentes de hidrógeno^{33 34}, los cuales, conllevan a una deslocalización de la densidad electrónica⁴⁵, esta deslocalización sumada a la presencia de las moléculas de fármaco sobre la superficie producen cambios en la ocupación de estados que se traducen en variaciones del potencial químico del sistema afectando considerablemente la capacitancia redox C_r ⁴⁴. Es decir, la interacción del fármaco con la β -Tubulina altera el ambiente químico local y modifica la nube electrónica de los ferrocenos aledaños (figura 9 b), generando un apantallamiento o desactivando los centros redox correspondientes, como se representa en la figura 9d. Lo anterior, se

⁴⁵ ZHIYUAN ZHANG y col. "The electron density delocalization of hydrogen bond systems". En: *Advances in Physics: X* 3.1 (2018), págs. 298-315.

evidencia experimentalmente como un decrecimiento de C_r ⁴⁶.

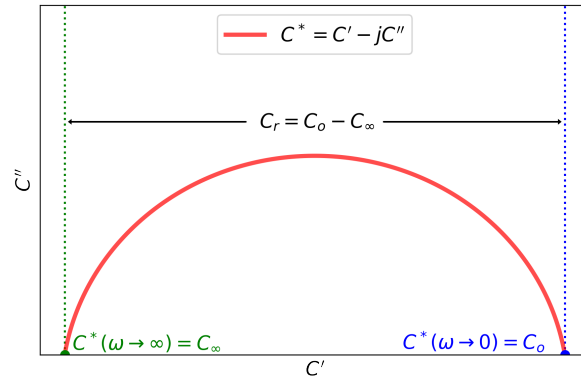
En el caso ideal, la capacitancia y la resistencia cuánticas son iguales para todas las moléculas redox sobre la superficie, $C_{qi} = C_{qj} = C_q$; $R_{qi} = R_{qj} = R_q$. Si en la superficie hay N centros redox, la capacitancia cuántica del sensor en ausencia de analito (blanco) estará dada por NC_q . Cuando el sensor interactúa con una concentración $[X]$ de analito se desactivan algunos centros redox, asumiendo que quedan N' centros redox activos ($N' < N$), la capacitancia cuántica resultante después de la interacción será $N'C_q$. Por tanto, hay un cambio en la capacitancia cuántica $\Delta C_q = (N - N')C_q$ asociado a la interacción receptor - analito. Teniendo en cuenta que, al darse la interacción, el analito permanecerá unido a la superficie por medio de su receptor, su aporte a la capacitancia externa es mínimo y puede considerarse que los cambios de C_{ext} son nulos, es decir, los cambios de C_r asociados a la interacción serán, en buena aproximación, iguales a los cambios de C_q ; $\Delta C_r \approx \Delta C_q$.

La gráfica de Nyquist o gráfica en el plano complejo de la capacitancia, C' Vs C'' , correspondiente al circuito equivalente de la figura 9c, se asemeja a un semicírculo cuyos cortes con el eje real representan la capacitancia a alta, $C_\infty = C^*(\omega \rightarrow \infty)$, y a baja frecuencia, $C_0 = C^*(\omega \rightarrow 0)$ y C_r puede ser obtenida como la distancia entre estos (figura 10). Como se mencionó anteriormente, la interacción del analito con el receptor se verá reflejada en una disminución de sitios redox activos sobre la superficie, esto se traduce en una reducción del diámetro del semicírculo en la gráfica de Nyquist.

Las gráficas de Nyquist obtenidas de los datos experimentales presentan un buen

⁴⁶ PAULO R. BUENO. "Common Principles of Molecular Electronics and Nanoscale Electrochemistry". En: *Analytical Chemistry* 90.12 (2018), págs. 7095-7106.

Figura 10. Gráfica ideal del espectro de capacitancia en el plano complejo, los cortes con el eje real representan la capacitancia a alta, $C_\infty = C^*(\omega \rightarrow \infty)$, y a baja frecuencia, $C_0 = C^*(\omega \rightarrow 0)$. Su diferencia determina la capacitancia redox $C_r = C_0 - C_\infty$.



ajuste a una semicircunferencia, confirmando que el sistema puede ser modelado por el circuito equivalente propuesto en la figura 9. Los parámetros de la semicircunferencia con mejor ajuste a los datos experimentales se obtuvieron por modelado inverso haciendo uso de la librería *semiCirclesEISModel* de python, escrita por David A. Miranda, Ph.D., e implementada en el Jupyter Notebook del anexo B. Esta librería ajusta los datos a la ecuación:

$$y = -B \pm \sqrt{R^2 - (x + A)^2} \quad (8)$$

$$R^2 = A^2 + B^2 - C \quad (9)$$

A, B, C, R , son los parámetros de la circunferencia, x es la parte real de la capacitancia y, y menos la parte imaginaria.

La capacitancia redox se definió como distancia entre los cruces con las con las abscisas:

$$C_r = C_0 - C_\infty \quad (10)$$

Donde C_0 es la capacitancia a bajas frecuencias y C_∞ la capacitancia a alta frecuencia.

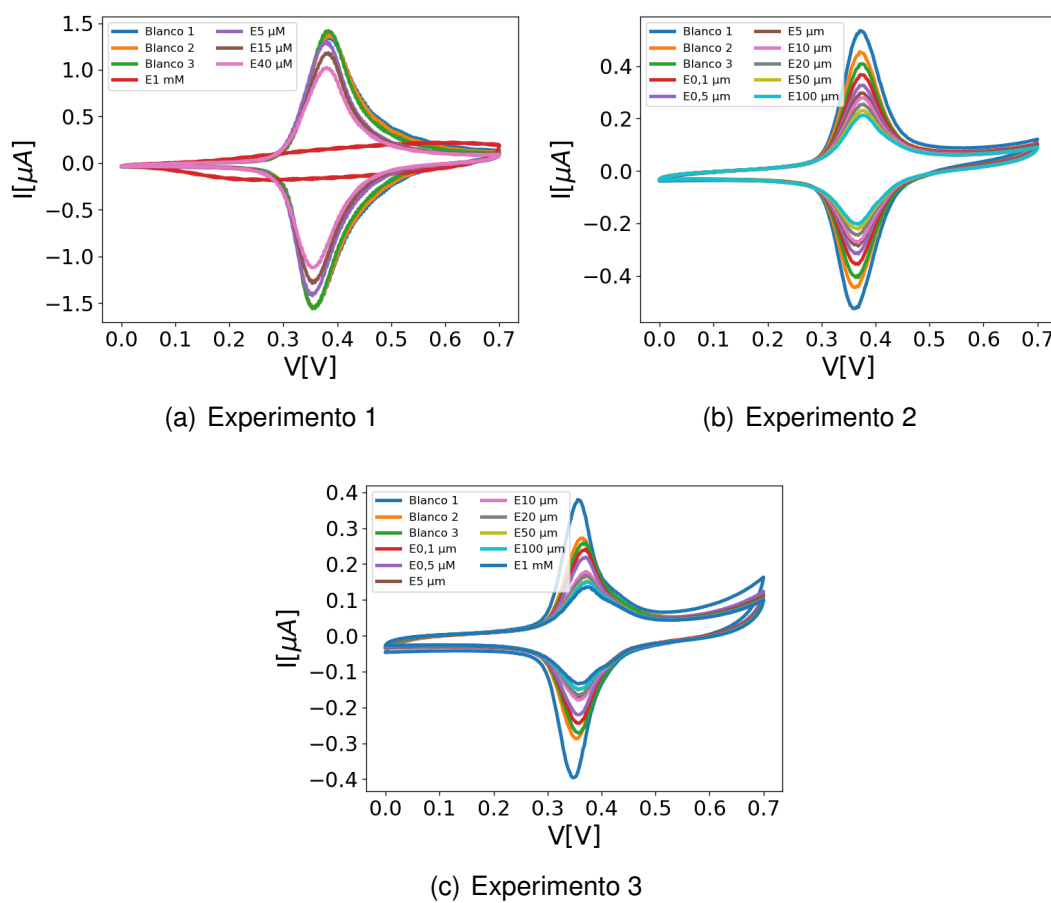
En esta sección se muestran los resultados de ECE obtenidos para el biosensor interactuando con Epotilona B, Paclitaxel y docetaxel. Para cada fármaco se presentan las curvas de CV, figuras 11, 13 y 15 y las gráficas de Nyquist, figuras 12, 14 y 16, en las que las curvas punteadas de colores corresponden al promedio del triplicado de los datos obtenidos de ECE para cada concentración de fármaco, la línea gris es el ajuste de cada curva a un semi-círculo.

2.2.1. Epotilona B

Voltamperometría Cíclica CV Las curvas de la figura 11, corresponden a al último ciclo de las CV's de tres experimentos realizados en diferentes días con Epotilona B. Cada curva se construyó utilizando el valor medio del triplicado de los datos. Se puede observar que, en los tres casos, se obtuvo un potencial de media onda en el rango de $0.35[V] \leq E_{1/2} \leq 0.40[V]$ para todas las concentraciones de epotilona B.

Además de ser útiles para obtener el potencial de media onda $E_{1/2}$, alrededor del cual se toma la medida de ECE, los voltamperogramas proporcionan información de las condiciones de la superficie que afectarán directamente la respuesta del sensor (ver sección 1.2.2). Un ejemplo es la estabilidad de la SAM que puede ser evaluada por sucesivos ciclos de CV del sensor en ausencia de analito (blancos). En este caso se obtienen picos de oxidación y reducción que indican la presencia de centros redox sobre la superficie, si las moléculas de FcC11 están correctamente ancladas la cantidad de centros redox en la superficie se mantiene constante, de lo contrario la SAM puede perder moléculas de FcC11 en cada ciclo de CV y por tanto se redu-

Figura 11. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Epotilona B. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 [mM] como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. [mV/s]



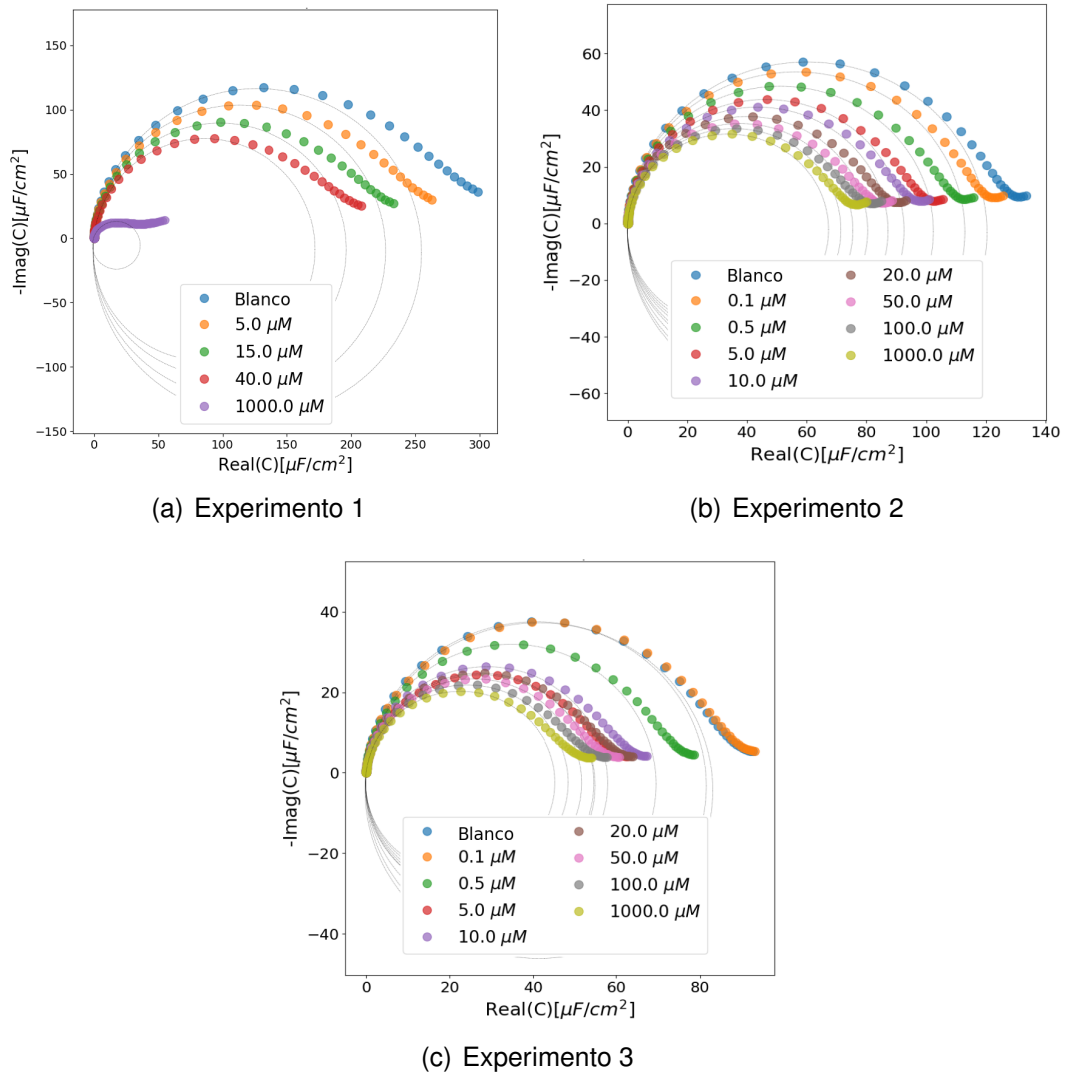
ce la cantidad de centros redox. Lo anterior se ve reflejado en una reducción de la corriente de pico. Idealmente, se puede decir que la superficie es estable si la corriente de pico se mantiene constante entre los diferentes ciclos de CV, en general, una superficie en buenas condiciones alcanza estabilidad después del quinto ciclo. Para garantizar una respuesta confiable del sensor, es importante que las variaciones del pico de corriente entre las dos últimas repeticiones de la medida de CV en los blancos sean mínimas.

Se realizaron por lo menos tres medidas de CV de los blancos con 10 ciclos cada una, las superficies que continuaron presentando variaciones superiores al 30 % en la corriente de pico o cambios drásticos en la forma del voltamperograma, después de la cuarta medida fueron descartadas, en la primera gráfica de la figura 11, correspondiente al experimento (1), la corriente de pico de los blancos tiene un valor alrededor de $1.4 [\mu A]$, y muestra estabilidad en las tres medidas. La curva correspondiente al experimento (2) muestra una corriente de pico igual $0.54 [\mu A]$ para el primer blanco, en este caso hay menor estabilidad de este valor en las sucesivas medidas cayendo a $0.45 [\mu A]$ para el segundo blanco y finalmente a $0.41 [\mu A]$ para el tercer blanco. En el experimento (3), la notoria diferencia entre la corriente de pico para el primer blanco, $\sim 0.4 [\mu]$, y del segundo, $0,28 [\mu A]$, evidencia alta inestabilidad de la monocapa, a partir del segundo blanco el sistema se muestra mas estable.

Por otro lado, las curvas correspondientes a las CV's del sensor interactuando con diferentes concentraciones de epotilona B, en los tres experimentos independientes presentan un decrecimiento gradual de la corriente de pico, con el aumento de concentración. En el experimento (1), la corriente de pico correspondiente a $1000 [\mu M]$, cae de manera abrupta y desaparecen los picos de reducción y oxidación, aunque esto puede asociarse a saturación total de los sitios de interacción, los siguientes

experimentos no confirman esta hipótesis, por tanto, esta concentración se descartó al construir las curvas de calibración.

Figura 12. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Epotilona B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 [mM], las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 [MHz] y 0.05 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV].



Espectros de Capacitancia Electroquímica ECE La figura 12, presenta las gráficas de Nyquist correspondientes a los tres experimentos realizados con epotilona

B, se puede observar que en todos los casos el diámetro de la curva disminuye con el aumento de la concentración, este es el comportamiento esperado para estas curvas; debido a que el diámetro se relaciona con C_r , su decrecimiento se atribuye a la ocupación de los centros redox por la interacción entre la β -Tubulina y la epotilona B.

Al igual que las curvas de CV, las gráficas de Nyquist evidencian diferencias significativas en las condiciones iniciales de cada uno de los experimentos realizados con epotilona B, el ejemplo mas claro es la medida de C_r para los blancos, cuyos valores fueron $254.4 [\frac{\mu F}{cm^2}]$, $120.34 [\frac{\mu F}{cm^2}]$ y $81.46 [\frac{\mu F}{cm^2}]$ para los experimentos (1), (2) y (3), respectivamente. Estas diferencias afectan la sensibilidad del sensor y evidencian la necesidad de fabricar superficies con mayor reproducibilidad o implementar una metodología apropiada de calibración del biosensor que las compense. Un ejemplo es el experimento (3), en el que las condiciones iniciales mostraron ser menos favorables que las de los dos anteriores. La corriente de pico de la CV de los blancos presentó alta inestabilidad y su valor para los blancos 2 y 3 estuvo por debajo de $0.4 [\mu A]$, asociado a una baja cobertura superficial de moléculas redox. Para este experimento la curva correspondiente a $0,5 [\mu M]$ se superpone con la de los blancos, indicando que en este caso el biosensor cuenta con menor sensibilidad a las concentraciones de epotilona B que en los otros dos experimentos.

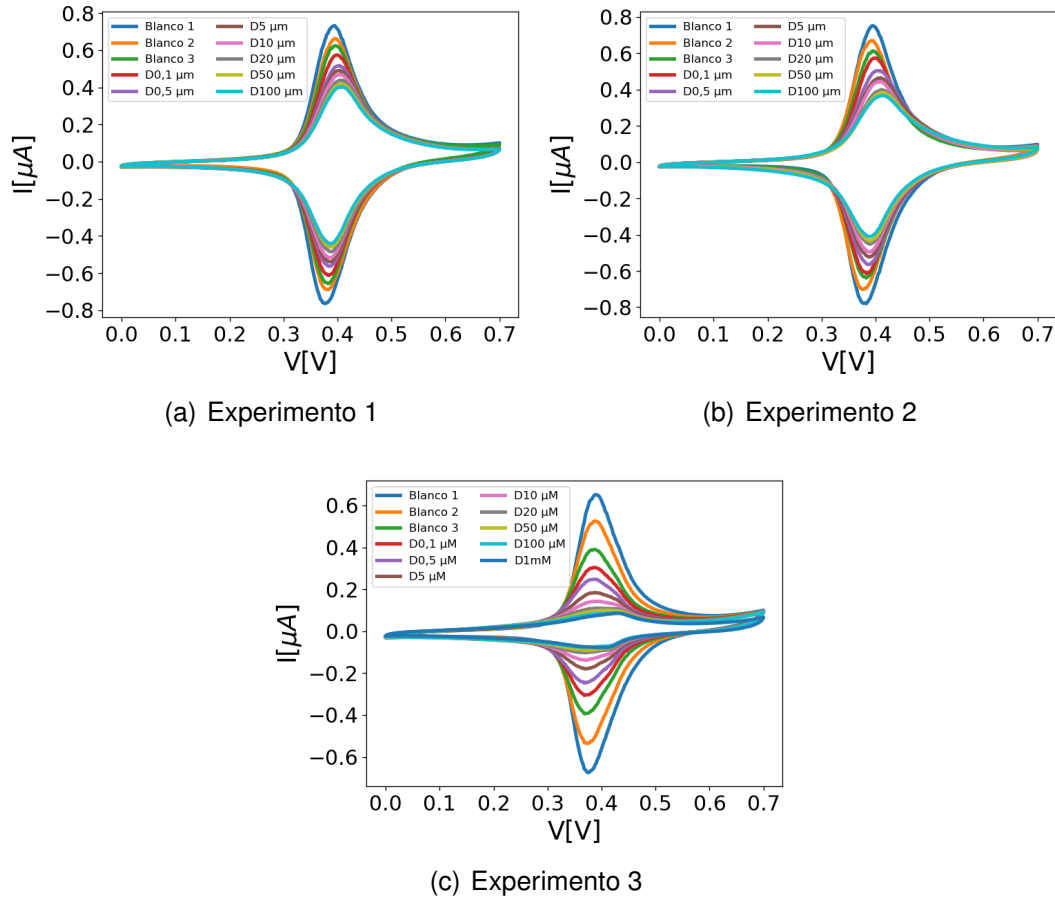
Por otro lado, tal como se observó se observó en la curva de CV correspondiente a la concentración $1000 [\mu M]$ de epotilona B en el experimento (1) en la que desaparecieron los picos de corriente, el diámetro de la gráfica de Nyquist de esta medida decreció abruptamente, el hecho de que esto no ocurra en los demás experimentos indica que la medida es errónea, por tanto no se tuvo en cuenta para los cálculos siguientes.

2.2.2. Docetaxel

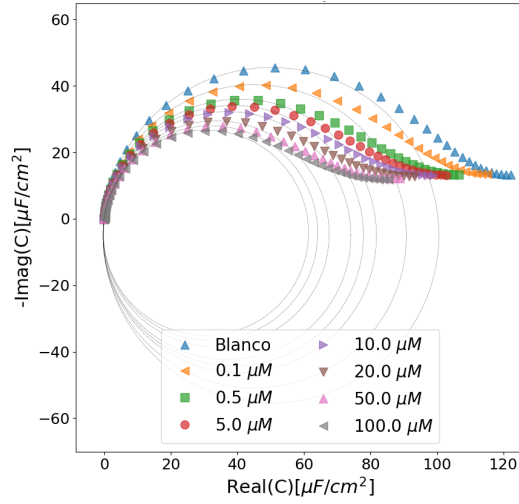
Voltamperometría Cíclica CV En la figura 13, se pueden observar las curvas de CV para los experimentos realizados con docetaxel. Al igual que en el caso de la epotilona B, el potencial de media onda está en el rango de $0.35[V] \leq E_{1/2} \leq 0.40[V]$, y el sistema presenta un comportamiento reversible, acorde con la SAM utilizada. El valor de la corriente de pico de para el primer blanco es mayor a $0.6 [\mu A]$ en los tres experimentos.

En los experimentos (1) y (2), las medidas de los plancos presentan estabilidad a partir del segundo blanco y, tal y como se espera, se observa un decrecimiento gradual de la corriente de pico con el aumento de la concentración de docetaxel. La superficie utilizada en el experimento (3), presentó mayor inestabilidad, lo cual, derivó en una caída del valor de la corriente de pico mas acelerada, respecto al aumento de concentración del fármaco, comparada con los experimentos (1) y (2). En total, cinco experimentos realizado con docetaxel debieron ser descartados después de medir varias veces el blanco y no obtener una corriente de pico estable, en dos de los casos el ΔE_p aumentó notoriamente tras cada medición alcanzando valores mayores a $60 [mV]$. Lo experimentos descartados no se reportan en este libro, sin embargo, es importante mencionarlos y resaltar que en este caso incrementó la dificultad para obtener un comportamiento estable del biosensor, dado que los experimentos con docetaxel fueron los últimos en realizase, la falta de estabilidad se atribuyó al desgaste y alteraciones sufridas por el sustrato de oro tras ser sometido a sucesivas limpiezas.

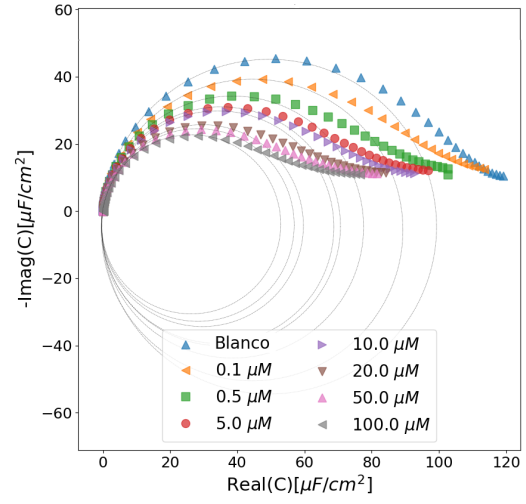
Figura 13. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Docetaxel. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 [mM] como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. [mV/s]



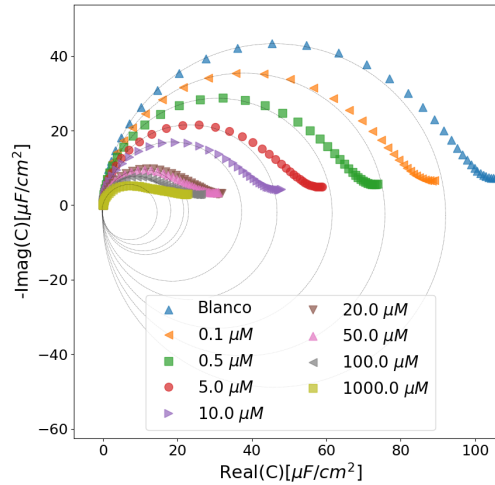
Espectros de Capacitancia Electroquímica (ECE) Las gráficas de Nyquist del espectro de capacitancia electroquímica, obtenidas con docetaxel se presentan en la figura 14. En este caso, el valor de C_r correspondiente al blanco es muy similar en los tres experimentos, manteniendo un valor en el rango $92.02 [\frac{\mu F}{cm^2}] < C_r < 100.46 [\frac{\mu F}{cm^2}]$. En todas las gráficas, C_r tiende a decrecer con el aumento de la concentración de docetaxel, lo cual, permite corroborar la interacción de este con la β -Tubulina anclada en la SAM. A pesar de que las condiciones iniciales son similares en los tres experimentos, en el experimento (3) el diámetro de la curva de Nyquist decrece



(d) Experimento 1



(e) Experimento 2



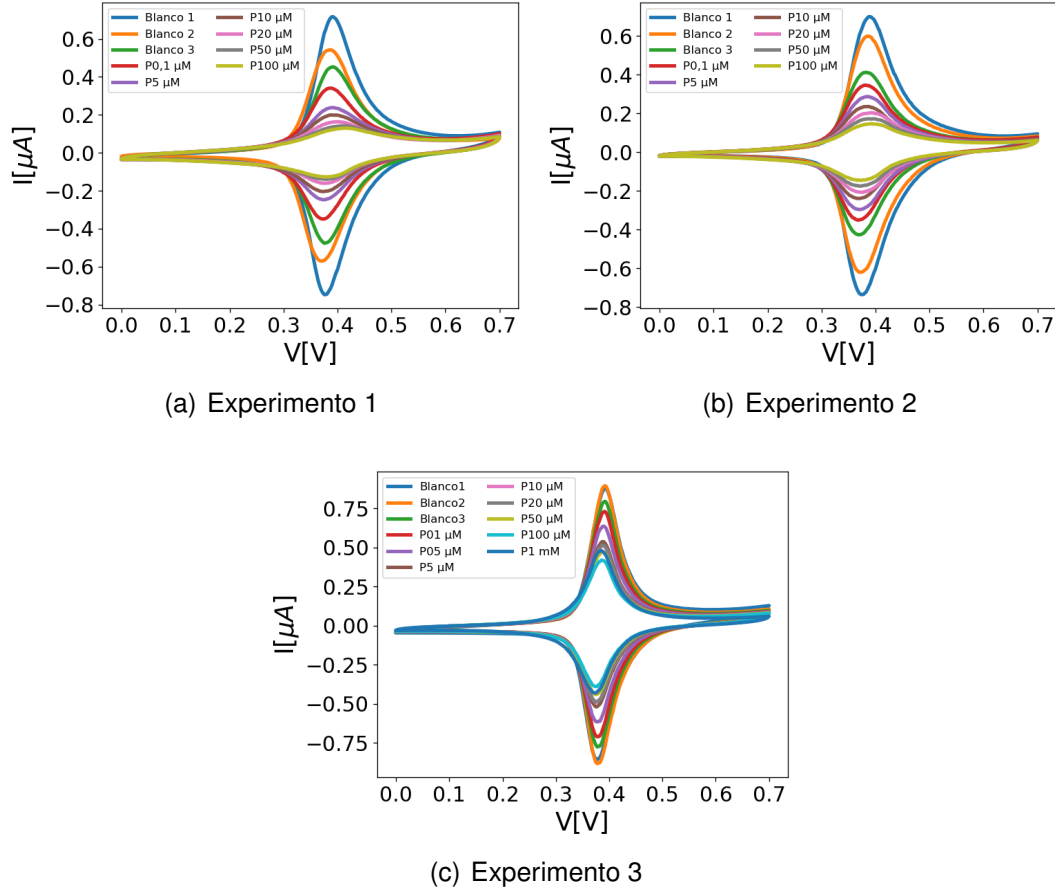
(f) Experimento 3

Figura 14. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Docetaxel B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 [mM], las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 [MHz] y 0.05 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV].

con la concentración a una tasa más acelerada que en los experimentos (1) y (2).

2.2.3. Paclitaxel

Figura 15. Curvas voltamperométricas del sensor interactuando con diferentes concentraciones de Paclitaxel. Para la medida se utilizó $TBAClO_4$ 20 [mM] como electrolito soporte y se realizó a una velocidad de barrido de 100. [mV/s]



Voltamperometría Cíclica CV Las curvas voltamperométricas de los experimentos realizados con paclitaxel se presentan en la figura 15. En este caso, el comportamiento de las SAM en los tres experimentos corresponde al reportado en la literatura para la SAM mixta de FcC11 y 16-MHDA, $0.35[V] \leq E_{1/2} \leq 0.40[V]$ y una diferencia de voltaje de pico menor a 60 [mV]. La corriente de pico en los tres casos es mayor a 0.6 [μA].

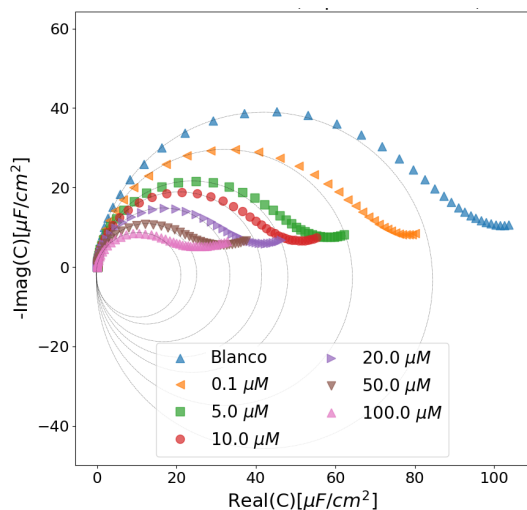
El experimento (1), presenta menor estabilidad en las medidas de los blancos, sin

embargo, el pico de corriente decrece gradualmente con la concentración, al igual que en los experimentos (2) y (3), en los que se observa una alta estabilidad desde la segunda medida del blanco. La superficie del experimento (3), presenta un comportamiento levemente diferente a la de los otros dos experimentos, estos cambios pueden afectar la reproducibilidad de la respuesta y serán corregidos por medio de calibración.

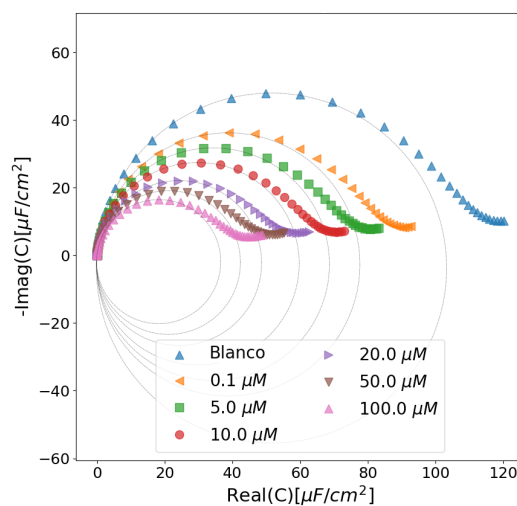
Espectroscopia de Capacitancia Electroquímica (ECE) Las curvas de ECE obtenidas al hacer interactuar el biosensor con paclitaxel se presentan en la figura 16, en este caso, las condiciones iniciales de los tres experimentos presentan menos diferencias entre si que en el caso de los experimentos con epotilona B. El menor valor de C_r para los blancos es $84.4 [\frac{\mu F}{cm^2}]$ mientras el mayor es $155.98 [\frac{\mu F}{cm^2}]$.

Al igual que con los demás fármacos, C_r disminuye con el incremento de concentración de paclitaxel, esta tendencia evidencia la existencia de interacción de este fármaco con β -Tubulina. En los tres experimentos la tasa de decrecimiento de C_r , respecto al aumento de concentración de paclitaxel, es similar. Por ejemplo, si se calcula la diferencia entre el valor de C_r para el blanco y para $100 [\mu M]$ de paclitaxel en los experimentos (1), (2) y (3) se obtiene $\Delta C_r = 63.44 [\frac{\mu F}{cm^2}]$, $\Delta C_r = 66.88 [\frac{\mu F}{cm^2}]$, $\Delta C_r = 75,87 [\frac{\mu F}{cm^2}]$ respectivamente. En el experimento (3), se observa la gráfica de Nyquist del espectro correspondiente a la concentración de $20 [\mu M]$ tiene un diámetro de $104.38 [\frac{\mu F}{cm^2}]$, mayor que el de la curva correspondiente a $10 [\mu M]$ cuyo valor es de $101.41 [\frac{\mu F}{cm^2}]$ dado que esto no ocurre en los demás experimentos, este comportamiento se considera anómalo y se puede atribuir errores durante la medición.

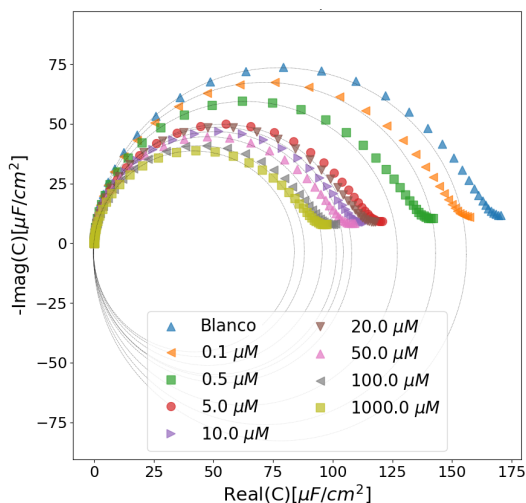
Figura 16. Gráficas de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica del sensor interactuando con los blancos y con diferentes concentraciones de Paclitaxel B. El electrolito soporte utilizado fue $TBAClO_4$ 20 [mM], las medidas se hicieron alrededor de $E_{1/2}$ entre 1 [MHz] y 0.05 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV].



(a) Experimento 1



(b) Experimento 2



(c) Experimento 3

3. INTERACCIÓN β -TUBULINA - FÁRMACO

En el capítulo (2), se describió como se obtuvo la capacitancia redox, C_r , del sensor interactuando con diferentes concentraciones de fármaco por medio de ECE. Es importante resaltar que C_r no es la capacitancia de un condensador clásico de placas paralelas en el que cada una de las placas cuenta con una cantidad indefinida de electrones. Por el contrario, el sistema estudiado es una monocapa de moléculas redox autoensambladas sobre un electrodo de oro, inmersos en un medio electrolítico y expuestos a un potencial externo que es controlado por un potencióstato, como se representa en la figura 17. La diferencia de potencial se genera entre el electrodo de oro, que se comporta como un reservorio de electrones, y las moléculas electroactivas, estas últimas cuentan con un número limitado de electrones.

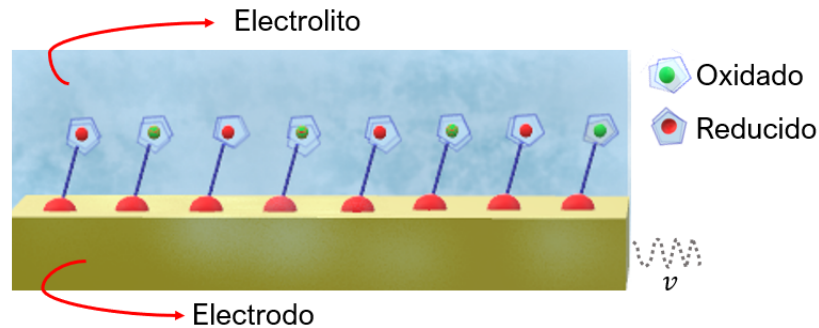
Desde el punto de vista de la física estadística, el electrodo con superficie modificada se puede modelar como un sistema de N partículas y energía E , interactuando con un baño térmico (medio electrolítico) de N' partículas y energía E' . De manera que el conjunto electrodo - electrolito tiene $\Omega_T(E_T, N_T) = \Omega(E, N)\Omega'(E', N')$ estados accesibles, energía $E_T = E + E'$ y $N_T = N + N'$ partículas.

Dado que el sistema y el baño térmico intercambian partículas, la función de partición está dada por:

$$Z = \sum_r e^{-(\beta E_r + \alpha N_r)} \quad (11)$$

Donde, el subíndice r denota el r -ésimo estado, $\beta = (\frac{\partial \ln \Omega(E', N')}{\partial E'})$ y $\alpha = (\frac{\partial \ln \Omega(E', N')}{\partial N'})$ son constantes características del baño térmico, cuya temperatura absoluta está dada por $T = (K\beta)^{-1}$ y se define el potencial químico como la energía necesaria para

Figura 17. Representación del sistema molecular anclado sobre el electrodo de oro (amarillo) e inmersos en un medio electrolítico (azul), las moléculas ancladas contienen centros redox (círculos rojos y verdes) que intercambian un electrón con el sustrato, todo el sistema está expuesto a un potencial externo v .



cambiar el número de partículas del sistema $\mu = -KT\alpha$ ⁴⁷.

Si se mantienen constantes tanto la energía como el potencial externo y se considera que solo hay intercambio de electrones entre el medio electrolítico y el electrodo modificado, el potencial electroquímico del sistema puede ser expresado como la variación de la energía respecto a la variación del número de partículas:

$$\mu = \frac{\partial E}{\partial N} \quad (12)$$

Adicional al potencial químico, el electrodo modificado está sometido a un potencial externo $v = q\phi$ que controla los niveles de reducción y oxidación de los estados

⁴⁷ F. REIF. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. Waveland Press, 2009.

electroquímicos. Es decir, el potencial electroquímico del sistema es ⁴⁸⁴⁹:

$$\bar{\mu} = \mu + q\phi \quad (13)$$

Por definición:

$$\frac{1}{C_r} = \frac{dV}{dq} \quad (14)$$

los diferenciales de potencial electroquímico y carga se se pueden expresar como $d\bar{\mu} = -qdV$ y $dq = edN$. Reescribiendo la ecuación (14) se puede ver explícitamente la relación que guarda la capacitancia redox con los cambios en el potencial electroquímico debidos al intercambio de partículas ⁴²⁵⁰:

$$\frac{Ne^2}{C_r} = \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial N} \quad (15)$$

Siendo C_r una capacitancia electroquímica compuesta por el aporte de procesos faradaicos y no faradaicos, y puede modelarse como dos condensadores en serie C_e y C_q :

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \quad (16)$$

C_e , es la capacitancia electrostática clásica correspondiente a la separación de las

⁴⁸ DAVID A. MIRANDA y PAULO R. BUENO. "Chemical Hardness of Mesoscopic Electrochemical Systems Directly Analyzed from Experimental Data". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 123.34 (2019), págs. 21213-21223.

⁴⁹ PAULO R. BUENO y DAVID A. MIRANDA. "Conceptual density functional theory for electron transfer and transport in mesoscopic systems". En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 19.8 (2017), págs. 6184-6195.

⁵⁰ JUAN BISQUERT. *Nanostructured energy devices : equilibrium concepts and kinetics*. 2015, pág. 352.

cargas y C_q es una capacitancia cuántica asociada a los cambios en el potencial químico del sistema μ , debidos a procesos de oxidación (la molécula cede un electrón) y reducción (la molécula gana un electrón) ocurridos en la monocapa molecular ⁴² ⁴⁸ ⁴⁹.

Por otro lado, el número de partículas del sistema está relacionado con la densidad electrónica, $N = \int_V \rho dV$, de manera que el potencial electroquímico puede expresarse como el variacional del funcional de energía, $E[\rho]$, respecto al variacional de la densidad electrónica ρ ,

$$\bar{\mu} = \left[\frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho} \right]_v \quad (17)$$

Donde,

$$\rho = |\Psi(r)| \quad (18)$$

Siendo $\Psi(r)$ la función de onda del sistema.

El sistema conformado por el electrodo con superficie modificada y el medio electro-lítico constituye un problema de múltiples partículas a escala nanométrica y a temperatura finita, que actualmente no puede ser simulado utilizando cuántica computacional. Recientemente David A. Miranda y Paulo R. Bueno, demostraron que para este tipo de sistemas, la capacitancia electroquímica medida experimentalmente, permite acceder a la dureza química del sistema η ⁴⁸, un índice de reactividad del sistema, definido en el marco conceptual de la teoría del funcional de densidad (DFT), como una medida de resistencia al cambio en la estructura electrónica del sistema, para un sistema sujeto a un potencial externo fijo v , la dureza química puede expresarse

como ⁵¹⁵²:

$$\eta = \frac{1}{2} \left[\frac{\delta \bar{\mu}(\rho)}{\delta \rho} \right]_v = \frac{1}{2} \left[\frac{\delta^2 E[\rho]}{\delta \rho^2} \right]_v \quad (19)$$

El funcional de energía propuesto por David A. Miranda y Paulo R. Bueno, se basa en la capacitancia electroquímica obtenida experimentalmente ¹¹:

$$E[\rho(\bar{\mu})] = \frac{\gamma \rho^2}{C_\mu} + E[\rho(\bar{\mu}_0)] \quad (20)$$

En el que $E[\rho(\bar{\mu}_0)]$ es una constante que depende del nivel de energía química de referencia escogido y γ es una constante que contiene el volumen del sistema V , el cuadrado de la carga eléctrica fundamental e y el número de oxidación Z :

$$\gamma = \frac{Z^2 e^2 V^2}{2} \quad (21)$$

Al calcular las derivadas de primer y segundo orden del funcional de energía se obtiene:

$$\left[\frac{\delta E}{\delta \rho} \right]_v = \frac{\delta \bar{\mu}}{\delta \rho} \left[\frac{\delta E}{\delta \bar{\mu}} \right]_v = \frac{2\gamma}{C_\mu} \frac{\delta E}{\delta \bar{\mu}} = \frac{2\gamma}{C_\mu} \left[\frac{2\gamma \rho}{C_\mu} \frac{\delta \rho}{\delta \bar{\mu}} - \frac{\gamma \rho^2}{C_\mu^2} \frac{\delta C_\mu}{\delta \bar{\mu}} \right]_v \quad (22)$$

$$\left[\frac{\delta E}{\delta \rho} \right]_v = \left[\frac{2\gamma \rho}{C_\mu} - \frac{2\gamma^2 \rho^2}{C_\mu^3} \frac{\delta C_\mu}{\delta \bar{\mu}} \right]_v \quad (23)$$

⁵¹ ROBERT G. PARR y RALPH G. PEARSON. "Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity". En: *Journal of the American Chemical Society* 105.26 (1983), págs. 7512-7516.

⁵² RALPH G. PEARSON. "Chemical hardness and density functional theory". En: *Journal of Chemical Sciences* 117.5 (2005), págs. 369-377.

$$\left[\frac{\delta^2 E}{\delta \rho^2} \right]_v = \frac{\delta \bar{\mu}}{\delta \rho} \frac{\delta}{\delta \bar{\mu}} \left[\frac{2\gamma\rho}{C_{\bar{\mu}}} - \frac{2\gamma^2\rho^2}{C_{\bar{\mu}}^3} \frac{\delta C_{\bar{\mu}}}{\delta \bar{\mu}} \right]_v \quad (24)$$

$$\left[\frac{\delta^2 E}{\delta \rho^2} \right]_v = \left[\frac{2\gamma}{C_{\bar{\mu}}} - \frac{\gamma^2\rho}{C_{\bar{\mu}}^3} \frac{\delta C_{\bar{\mu}}}{\delta \bar{\mu}} + \frac{12\gamma^3\rho^2}{C_{\bar{\mu}}^5} \left(\frac{\delta C_{\bar{\mu}}}{\delta \bar{\mu}} \right)^2 - \frac{4\gamma^3\rho^2}{C_{\bar{\mu}}^4} \frac{\delta^2 C_{\bar{\mu}}}{\delta \bar{\mu}^2} \right]_v \quad (25)$$

El electrodo con superficie modificada utilizado como sensor en este trabajo es un sistema mesoscópico, cuyo funcional de energía y dureza química pueden ser descritos por las ecuaciones (20) y (25) respectivamente. Aunque, esta última se expande en varios términos, los valores de capacitancia C_{μ} del sistema descrito son tales que $\frac{1}{C_{\mu}} \sim \frac{1}{C_{\mu}^3}$. Es decir, en la ecuación (25) solo el primer término es predominante, hecho que ha se puede observar experimentalmente [11] [48] [49]. De manera que la dureza química del sistema es, en buena aproximación inversamente proporcional a la capacitancia redox:

$$\eta \approx \frac{\gamma}{C_r} \quad (26)$$

3.0.1. Evaluación de la respuesta del sensor En general, la respuesta S de un sensor está relacionada con la concentración $[X]$ del analito. Para cuantificar la interacción analito-receptor se construyen curvas de calibración, es decir, gráficas de S en función de $[X]$; estas gráficas permiten calcular la afinidad entre el analito y el receptor. La afinidad es una medida de la tendencia que tienen dos moléculas a interactuar entre ellas.

La determinación de la afinidad fármaco-receptor se realiza con base al análisis de isotermas, en la literatura se reportan diversos modelos de isotermas⁵³, uno de

⁵³ NIMIBOFA AYAWEI, AUGUSTUS NEWTON EBELEGI y DONBEBE WANKASI. "Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms". En: *Journal of Chemistry* 2017 (2017). DOI: [10.1155/2017/1014561](https://doi.org/10.1155/2017/1014561)

los mas usados es el de Langmuir. Las isothermas de Langmuir permiten estudiar el proceso de adsorción de una especie sobre una superficie cuando se alcanza el equilibrio, así como, la tasa de adsorción (TA) y la tasa de desorción (TD) de la especie sobre la superficie son iguales. La tasa de adsorción es proporcional a la concentración de la especie en estudio $[X]$ y a la fracción de superficie disponible $(1 - \theta)$ ¹⁰:

$$TA = \alpha[X](1 - \theta) \quad (27)$$

Donde α es la tasa de asociación de la especie en la superficie.

Por otro lado la tasa de desorción es proporcional a la fracción de área superficial ocupada

$$TD = V_1\theta \quad (28)$$

V_1 se conoce como la tasa de disociación.

Igualando las ecuaciones (27) y (28) se obtiene la isoterma de Langmuir original:

$$\theta = \frac{\alpha[X]}{V_1 + \alpha[X]} \quad (29)$$

En términos farmacológicos, θ es igual a la relación de complejos fármaco-receptor $[xXR]$ sobre la concentración total de receptores $[R_t]$ y está dada por:

$$\theta = \frac{[XR]}{[R_t]} = \frac{K_A[X]}{K_A[X] + 1} \quad (30)$$

donde $K_A = \frac{\alpha}{V_1}$ es la constante de afinidad.

Suponiendo un comportamiento ideal, la respuesta del sensor S , estará directamen-

te relacionada con la fracción de receptores ocupados²⁸ $S = S_{max}\theta$, donde S_{max} es la respuesta correspondiente la máxima cantidad de receptores ocupados, es decir, cuando θ es acerca a la unidad. Reemplazando la ecuación (30) se obtiene una expresión que puede ser linealizada de la forma:

$$\frac{[X]}{S} = \frac{[X]}{S_{max}} + \frac{1}{K_a S_{max}} \quad (31)$$

Sin embargo, las isothermas de Langmuir no describen procesos en los que la superficie de adsorción es heterogénea. Para estos casos es posible utilizar el modelo empírico de Freundlich que describe la adsorción reversible no ideal. En su forma lineal las isothermas de Freundlich pueden expresarse como:

$$y = mx + b \quad \left\{ \begin{array}{l} x = \log(C_e) \\ y = \log(q_e) \\ m = \frac{1}{n} \\ b = \log(K_f) \end{array} \right. \quad (32)$$

Donde q_e es la cantidad de sitios ocupados sobre la cantidad de sitios totales disponibles en equilibrio, C_e es la concentración de adsorbatos en equilibrio, K_f es la constante de Freundlich asociada con la capacidad de adsorción y $1/n$ describe la intensidad de adsorción, si $0 < 1/n < 1$ la adsorción es favorable, si $1/n = 1$ la adsorción es irreversible⁵⁴⁵³.

Para evaluar la calidad de detección de un sensor por su analito de interés se calculan el Límites de Detección (LOD) y el límite Cuantificación (LOQ). El LOD es una

⁵⁴ MOHAMMAD A. AL-GHOUTI y DANA A. DA'ANA. "Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review". En: *Journal of Hazardous Materials* 393 (2020), pág. 122383.

medida de la mínima concentración de analito para la cual, la respuesta del sensor presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto a la respuesta del blanco. El LOQ es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada a partir de la respuesta del sensor. De acuerdo con la IUPAC, si σ es la desviación estándar de la respuesta respecto al blanco, el LOD se calcula como 3σ y el LOQ como 10σ ⁵⁵.

3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN

Se utilizó la dureza química, definida en la ecuación (26), como respuesta del sensor. Para cuantificar la interacción entre la β -Tubulina y cada uno de los fármacos se construyeron las curvas de calibración y se calcularon los límites de detección y cuantificación. A continuación, se describen dos métodos de calibración propuestos, uno usando la dureza química obtenida experimentalmente, y el otro usando la dureza química efectiva que se define mas adelante en este capítulo. Se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los métodos.

En todos los casos los cálculos se llevaron a cabo utilizando algoritmos desarrollados en lenguaje python e implementados en una notebook de Jupyter (Anexo B).

3.1.1. Dureza química experimental Se construyeron curvas analíticas de la respuesta del sensor S en función del logaritmo de la concentración de analito $\text{Log}[X]$, como sugieren las isothermas de Langmuir y de Freundlich. En este caso,

⁵⁵ GARY L LONG y J D WINEFORDNER. "Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition". En: *Anal. Chim. Acta* 55.7 (1983).

el analito es cada uno de los fármacos y la respuesta del sensor es la dureza química experimental de la interacción fármaco - β -Tubulina. De acuerdo con la IUPAC ⁵⁵ la respuesta del sensor se calcula como la diferencia entre dureza química obtenida cuando el sensor interactúa con una concentración dada de analito $\eta_{[X]}$ y la dureza química del blanco, es decir, en ausencia de analito η_B :

$$S = \eta_{[X]} - \eta_B \quad (33)$$

Dada la dificultad para obtener SAM's con alta reproducibilidad, no es viable tomar el blanco como referencia para el cálculo de los LOD y LOQ, ya que esta medida dependerá directamente de las condiciones de la SAM cuya obtención es independiente para cada experimento y sus propiedades pueden variar durante su formación, esto implica que la medida del blanco varía entre diferentes experimentos. Esta dificultad se superó redefiniendo los límites de detección y cuantificación en función de la curva de calibración, como se describe a continuación:

Sea $(x_i, \eta_i)_j$ el j-ésimo dato experimental, correspondiente con la i-ésima concentración y la dureza química para la misma. Si se gráfica la concentración en las abscisas y la dureza química en las ordenadas, los datos pueden ser descritos por una línea recta conocida como curva de calibración. En este caso, es posible definir la desviación estándar σ_η en términos de la dispersión de los datos respecto a la línea recta de la curva de calibración obtenida, es decir:

$$\sigma_\eta = \frac{\sum_{i,j}^N [\eta_j(\log[x_i]) - \bar{\eta}(\log[x_i])]^2}{N - 1} = \frac{\sum_{i,j}^N [\eta_j(\log[x_i]) - m\log[x_i] - b]^2}{N - 1} \quad (34)$$

Donde, m y b son la pendiente y el punto de corte de la curva de calibración respectivamente y $N=3$ es el número de medidas por concentración.

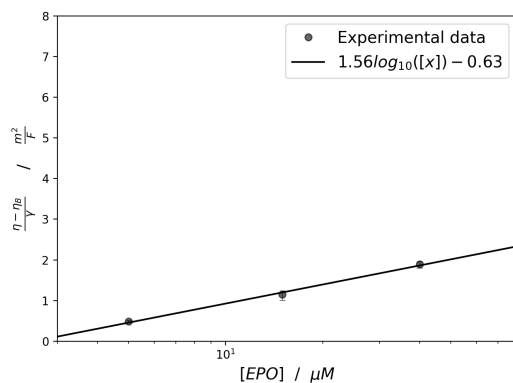
De esta manera, los límites de detección y cuantificación se pueden calcular respecto a la curva de calibración como $3\sigma_\eta$ y $10\sigma_\eta$ respectivamente.

Las curvas de calibración obtenidas para cada fármaco se presentan en las figuras 18, 19 y 20. La figura 18, muestra las curvas correspondientes a los tres experimentos realizados con Epotilona B. Se puede observar que las curvas de calibración obtenidas para este fármaco presentan parámetros son similares en cada uno de los tres experimentos independientes. Las pendientes de las tres gráficas difieren en menos de 0.13 unidades y la incertidumbre de cada medida es mucho menor que la diferencia entre la respuesta a diferentes concentraciones de fármaco. Al analizar los resultados de los tres experimentos juntos, la curva no sufre cambios abruptos respecto de las curvas de cada experimento, sin embargo, se observa una alta incertidumbre en los datos, la cual se atribuye a diferencias entre los blancos utilizados para cada experimento. Esta incertidumbre se refleja en los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

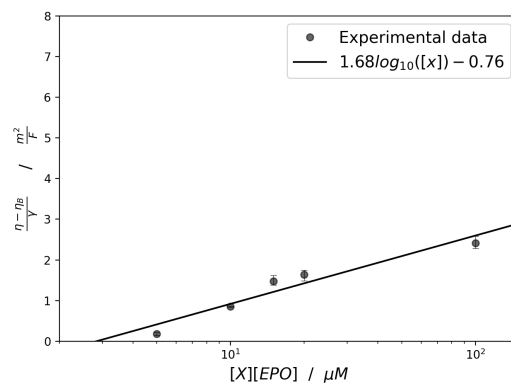
En la tabla (1), se presentan los LOD y LOQ, se puede observar la diferencia en los valores obtenidos para cada experimento por separado, y el valor obtenido al agrupar los datos de los experimentos realizados con cada fármaco. Para Epotilona B, los límites de detección y cuantificación calculados con los datos de los tres experimentos aumentan en un orden de magnitud comparados con los de los experimentos individuales, los LOD obtenidos en los experimentos 1, 2 y 3 son 164 $[nM]$, 410 $[nM]$ y 681 $[nM]$ respectivamente, mientras que el mismo índice calculado para los tres experimentos agrupados es 3.25 $[\mu M]$.

Siguiendo el mismo procedimiento con los datos de los experimentos realizados con Docetaxel, se construyeron las curvas de la figura 19, en este caso se observan mayores diferencias entre los experimentos independientes, los rangos de valores de la respuesta y la pendiente de las curvas varían notoriamente de un experimento

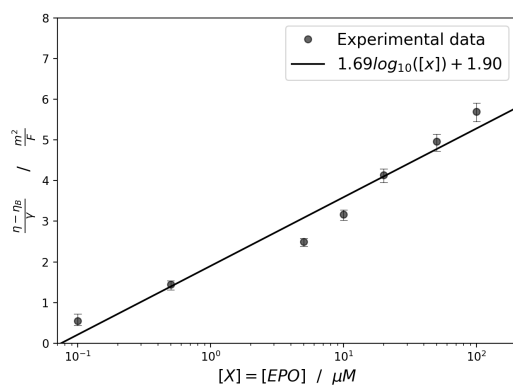
Figura 18. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Epotilona B, utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[DCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos.



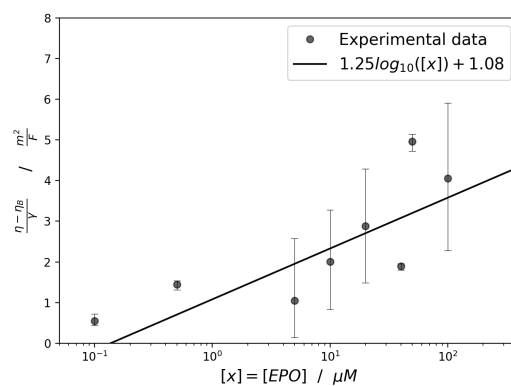
(a) Experimento 1



(b) Experimento 2



(c) Experimento 3



(d) Todos los experimentos

a otro, lo cuál, como se mencionó anteriormente se atribuye a las condiciones iniciales de la superficie de interacción, a pesar de que todas las SAM's utilizadas se obtuvieron a través del mismo procedimiento, su composición final y empaquetamiento se ven alterados por condiciones ambientales y otros factores difícilmente controlables, afectando directamente la sensibilidad del sensor. Los LOD Y LOQ obtenidos para docetaxel fueron más altos respecto de los otros fármacos, al analizar los experimento agrupados estos valores aumentan en aproximadamente un orden de magnitud, en este caso el LOD para los experimentos agrupados fue $4.06 [\mu M]$.

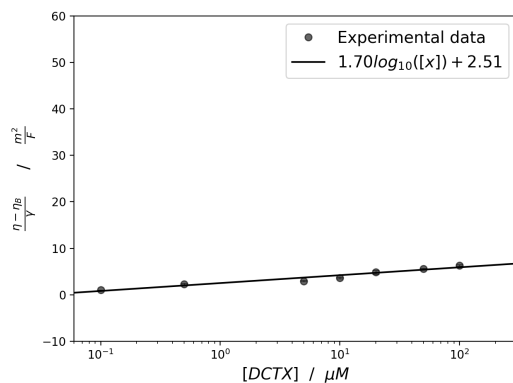
Las curvas de calibración para el Paclitaxel, se presentan en la figura (20), se pueden observar cambios significativos en los parámetros de las curvas correspondientes a cada experimento independiente, por ejemplo, los datos del experimento 3 presentan mayor dispersión que los de los experimentos 1 y 2, esto se evidencia en los valores LOD y LOQ, que para el experimento 3 es igual a $0.767 [\mu M]$, mas del doble que para los otros dos experimentos cuyo valor es menor a $0,4 [\mu M]$ en ambos casos. El aumento en la incertidumbre de los datos al analizar los experimentos en conjunto es considerable, alcanzando un valor igual a $2.725 [\mu M]$.

Estos resultados evidencian la necesidad de tomar como respuesta una cantidad que sea independiente de la superficie de interacción para este tipo de sensores, esto implica, reducir la dependencia de la respuesta del sensor a una concentración $[X]$ del fármaco, de la respuesta al blanco.

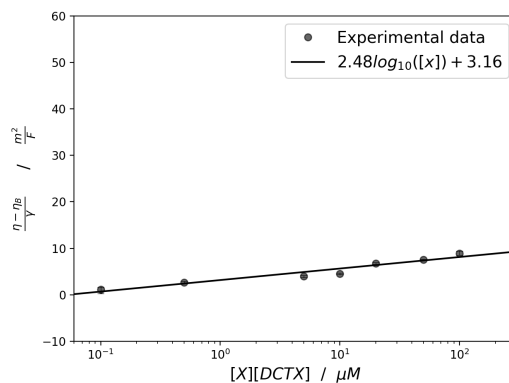
3.2. DUREZA QUÍMICA EFECTIVA

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta este punto, es claro que un obstáculo a superar para el sensor diseñado es la falta de reproducibilidad en la respuesta, ocasionada por variaciones en la superficie de interacción, que a su vez, implican

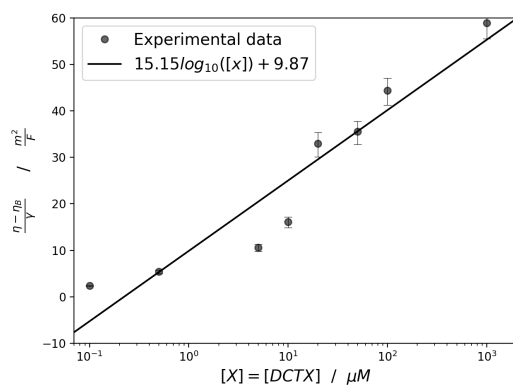
Figura 19. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Docetaxel, utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[DCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos.



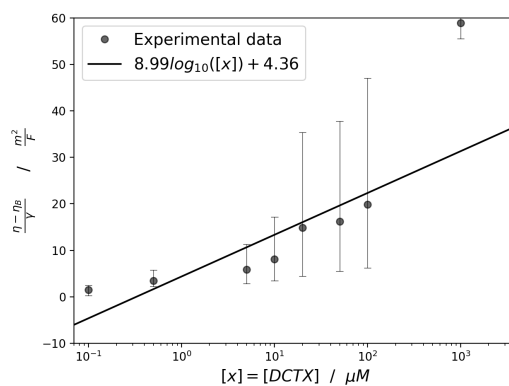
(a) Experimento 1



(b) Experimento 2

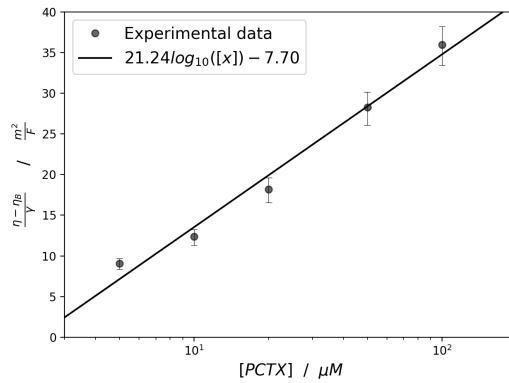


(c) Experimento 3

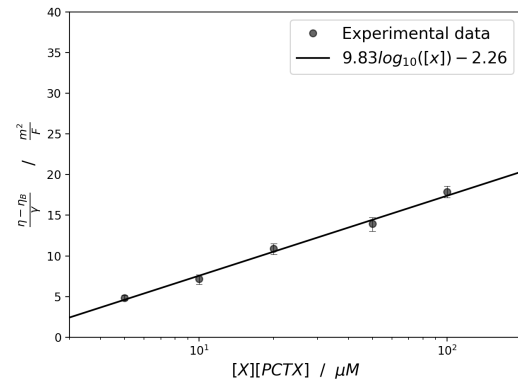


(d) Todos los experimentos

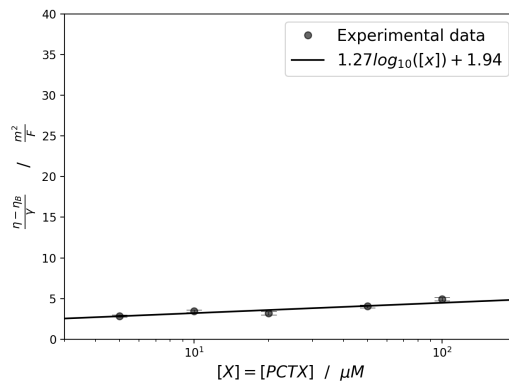
Figura 20. Curvas de calibración obtenidas para los tres experimentos realizados con Paclitaxel utilizando la dureza química experimental como respuesta del sensor. Se gráfica $\eta - \eta_B$ en función del logaritmo de la concentración de Docetaxel $\text{Log}[PCTX]$. Cada dato se midió por triplicado y la línea sólida es la recta que mejor se ajusta a la media del triplicado de los datos.



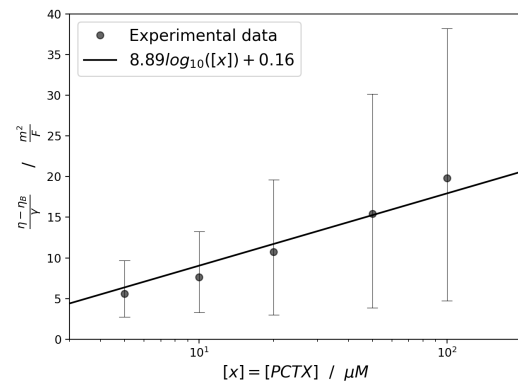
(a) Experimento 1



(b) Experimento 2



(c) Experimento 3



(d) Todos los experimentos

Tabla 1. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos para Epotilona, Docetaxel y Paclitaxel usando una calibración que depende de la superficie de interacción

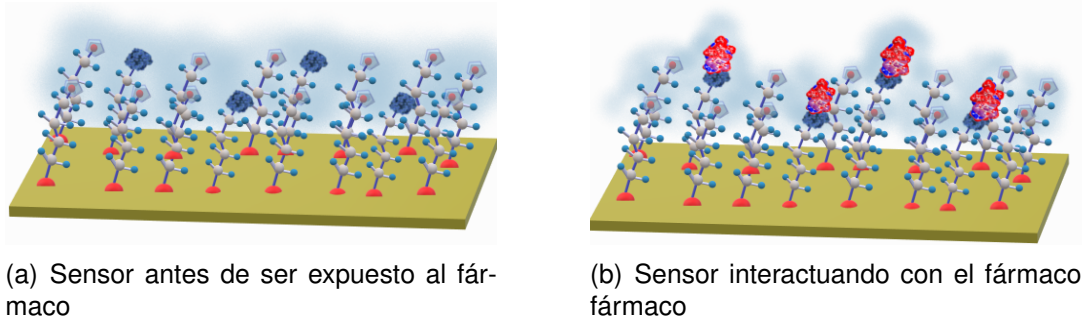
Fármaco	Experimento	LOD [μM]	LQD [μM]
EPO	1	0.164	0.547
	2	0.410	1.368
	3	0.681	2.270
	Todos	3.251	10.838
DCTX	1	0.837	2.790
	2	0.906	3.021
	3	1.240	4.134
	Todos	4.063	13.546
PCTX	1	0.281	0.939
	2	0.215	0.715
	3	0.767	2.556
	Todos	2.725	9.084

que el blanco es variable para cada superficie analizada experimentalmente. Este, es un reto que no solo enfrentan los sensores basados en SAM's, la dificultad para obtener reproducibilidad debido factores relacionados con la superficie de interacción es uno de los mayores problemas reportados en el diseño y elaboración de sensores ²⁵. Este problema se puede superar si se logra eliminar la dependencia entre la respuesta del sensor y la superficie de interacción.

La interacción del receptor con el analito, en este caso β -Tubulina - fármaco, tiene lugar a escalas nanoscópicas y puede ser estudiada a través variaciones en la densidad electrónica del sistema definida en la ecuación (18).

La densidad electrónica ρ de la superficie del sensor en equilibrio se ve alterada cuando el receptor entra en contacto con el analito, dando lugar a una nueva densidad ρ' ²³. Este fenómeno se puede representar por cambios en la nube electrónica como se esquematiza en la figura 21. Por tanto, medir la densidad electrónica efectiva $\Delta\rho = \rho' - \rho$, es decir, la diferencia entre la densidad electrónica del sistema antes

Figura 21. Esquema de la nube electrónica de la superficie de interacción del sensor antes y después de ser expuesto a un fármaco



y después de ser expuesto al analito equivale a detectar dicha interacción.

La dureza química descrita por las ecuaciones (19) y (26), presenta una relación entre la respuesta del sensor y la densidad electrónica del sistema, la cual, es función de la capacitancia electroquímica $C_r = \frac{dq}{dV}$. De esta manera, la densidad electrónica del sistema antes de ser expuesto al analito está dada por $\rho = \zeta dq = \zeta C_r^{[b]} dV$, y después de la interacción con una concentración $[x]$ de analito, $\rho' = \zeta dq' = \zeta C_r^{[x]} dV$, donde ζ es una constante de proporcionalidad. Por tanto la densidad electrónica efectiva está dada por:

$$\Delta\rho = \rho' - \rho \approx \zeta(C_r^{[x]} - C_r^{[b]})dV \quad (35)$$

En este sentido, se puede definir la dureza química efectiva como:

$$\eta_{x-b} = \frac{\gamma}{C_r^{[x]} - C_r^{[b]}} \quad (36)$$

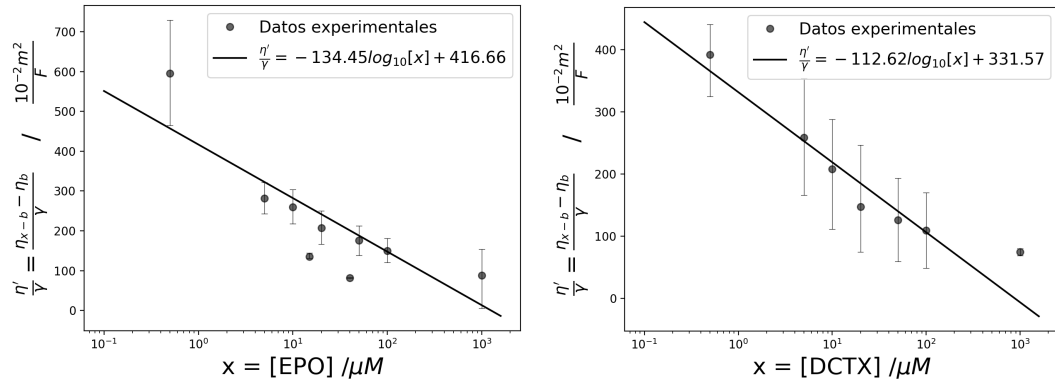
Donde, $C_r^{[x]}$ es la capacitancia redox del sistema interactuando con una concentración $[x]$ de analito y $C_r^{[b]}$ la capacitancia redox del sistema para $[x] = 0$ ó blanco y γ es una constante que contiene el volumen, el cuadrado de la carga elemental y el numero de oxidación reducción del sistema ^{48 49}.

3.2.1. Dureza química efectiva de fármacos taxanos

La dureza química efectiva

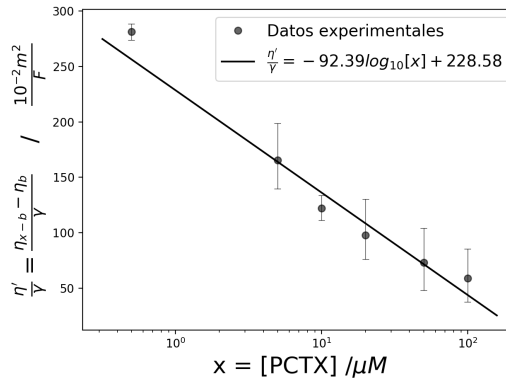
es un parámetro independiente de las condiciones iniciales del sistema, a través de una calibración adecuada permite mejorar la reproducibilidad de la medida de interacción receptor - analito. Utilizando este concepto y siguiendo la recomendación de la IUPAC de contrastar la medida de una concentración $[x]$ de analito con la del blanco ⁵⁵, se redefinió la respuesta de sensor como:

Figura 22. Curvas de calibración utilizando como respuesta del sensor la dureza química efectiva, obtenidas con diferentes concentraciones de tres fármacos.



(a) Epotilona

(b) Docetaxel



(c) Paclitaxel

$$\eta' = \eta_{x-b} - \eta_b = \frac{\gamma}{C_r^{[x]} - C_r^{[b]}} - \frac{\gamma}{C_r^{[b]}} \quad (37)$$

Las curvas de calibración de la figura 22 se construyeron graficando η' en función del logaritmo de la concentración $\log[x]$, en estas curvas se presentan todos los datos de todos los experimentos realizados con cada uno de los fármacos: epotilona B, docetaxel y paclitaxel. A diferencia de las curvas obtenidas con otros métodos de calibración mostrados anteriormente, las curvas construidas con η' presentan menor incertidumbre en los datos y sus parámetros se conservan de un experimento a otro. Se puede observar que la pendiente de todas las curvas de la figura 22 es aproximadamente igual a $-1.0 \times 10^{-2} \left[\frac{m^2}{FM} \right]$, el mismo valor que se obtiene para la curva de calibración correspondiente a cada experimento independiente de cada fármaco (anexo A). Igualmente, el punto de corte presenta un valor entre $0.02 \left[\frac{m^2}{F} \right]$ y $0.04 \left[\frac{m^2}{F} \right]$ en todos los casos.

3.2.2. Límites de detección y cuantificación Los límites de detección y cuantificación consignados en la tabla 2 corresponden al sensor, usando como respuesta la dureza química efectiva η_{x-b} , estos límites se calcularon con la desviación estándar respecto a la curva de calibración (ecuación 34). En este caso, los límites obtenidos para experimentos individuales son mayores que los correspondientes a la calibración utilizando como respuesta la dureza química experimental (Tabla 1). Sin embargo, al utilizar η_{x-b} , se logra reducir la diferencia entre el LOD y el LOQ de cada experimento individual respecto a los calculados con los datos de todos los experimentos independientes realizados con cada fármaco.

De manera que, utilizando η_{x-b} , los límites obtenidos para experimentos individuales son comparables a los obtenidos al agrupar los datos de múltiples experimentos independientes realizados con determinado fármaco. Por ejemplo, para epotilona

Tabla 2. Límites de detección LOD y de cuantificación LOQ calculados utilizando la dureza química efectiva η_{x-b} como respuesta del sensor.

Fármaco	Experimento	LOD [μM]	LQD [μM]
EPO	1	1.503	5.011
	2	1.383	4.611
	3	1.973	6.576
	Todos	2.018	6.729
DCTX	1	0.561	1.869
	2	0.446	1.486
	3	0.694	2.315
	Todos	1.555	5.184
PCTX	1	0.342	1.140
	2	0.465	1.550
	3	0.824	2.749
	Todos	0.734	2.446

Los valores de LOD obtenidos de experimentos independientes están entre 1.503 [μM] y 1.973 [μM] y el LOD calculado agrupando los datos de todos los experimentos en una misma curva de calibración es 2.018 [μM]. Adicionalmente, para todos los fármacos estudiados se obtuvieron LOD's similares, con un valor cercano a 2 [μM] en el caso de epotilona B y Docetaxel, y ~ 0.7 [μM] para paclitaxel. Lo cual es un resultado esperado ya que los tres fármacos tienen mecanismo de acción similares y la naturaleza de la interacción entre cada uno de ellos y la β -Tubulina debe ser la misma. El fármaco con menor LOD en los experimentos individuales es el docetaxel con valores menores a 0.7 [μM], esto concuerda con resultados experimentales reportados en la literatura en los que se ha mostrado que este fármaco tiene mayor actividad in-vitro que el paclitaxel ²⁹.

En este sentido, se logró cuantificar la interacción de la β -Tubulina con fármacos antimitóticos de tipo taxano utilizando la dureza química medida experimentalmente, los resultados muestran que la dureza química efectiva es un índice de reactividad

que permite cuantificar la interacción receptor-analito en general, con alta reproducibilidad e independiente de las condiciones de la superficie de interacción.

El hecho de que las curvas de calibración construidas con la dureza química efectiva (figura 22), presenten los mismos parámetros para los tres fármacos utilizados en el estudio, y teniendo en cuenta que todos tienen el mismo mecanismo de acción conocido, sugiere que estos parámetros guardan una relación estrecha con la naturaleza de la interacción receptor-analito independiente de las condiciones de la superficie. En este sentido la metodología propuesta en este trabajo promete ser de utilidad para otros sensores, y presenta una solución a los problemas de reproducibilidad relacionados con las condiciones de la superficie de interacción.

3.2.3. Afinidad de interacción β -Tubulina - Fármacos y capacidad de detección del sensor

Los resultados de la sección 3.2.1 muestran que la relación que guarda η' con la concentración de fármaco no es la descrita por las isothermas Langmuir. La razón de esto puede ser la heterogeneidad en la superficie funcionalizada debido a la presencia de β -Tubulina. Para estudiar la interacción de la β -Tubulina con cada uno de los fármacos se utilizó el modelo de Freundlich descrito por la ecuación (32).

La ecuación que describe el comportamiento de η' en función de la concentración de fármaco $[x]$, es de la forma:

$$\eta' = -\Gamma \log[X] + \Lambda \quad (38)$$

Donde Γ y Λ son respectivamente, la pendiente y el punto de corte de las curvas de calibración en las que se utilizó como respuesta la dureza química efectiva (figura 22).

En los experimentos los fármacos se comportan como adsorbatos, por tanto, el logaritmo de la concentración de adsorbatos $\log(C_e)$ en el modelo de Freundlich (ecuación 32), corresponde al logaritmo de la concentración de fármaco $\log[X]$:

$$\log(q_e) = \frac{1}{n}\log[X] + \log(K_f) \quad (39)$$

Despejando $\log[X]$ en las ecuaciones (38) y (39) y comparando termino a termino se obtiene $n\log(q_e) = -\frac{q'}{F}$ y $n\log(K_f) = -\frac{A}{F}$, por tanto, es posible calcular K_f como:

$$K_f = 10^{-\frac{A}{nF}} \quad (40)$$

La interacción entre un fármaco y su receptor suele ser reversible¹⁰, por tanto, es de esperar que para la interacción entre cada uno de los fármacos con la β -Tubulina, la relación $1/n$ sea menor que 1. En este caso, se utilizó un valor $1/n = 0.5$ para estimar el valor de K_f correspondiente a cada fármaco, las constantes obtenidas fueron $K_f = 28.20 [nM]$ para epotilona B, $K_f = 57.93 [nM]$ para paclitaxel y $K_f = 33.72 [nM]$ para docetaxel. En la literatura se encuentran reportes de las constantes de disociación de fármacos taxanos con β -Tubulina K_d del orden de $10^7 M^{-1}$, esta constante corresponde al inverso de la constante de asociación K_a que puede asociarse a K_f , haciendo los respectivos cálculos, las constantes de afinidad que se obtienen de los valores reportados para oscilan alrededor de $1.64 [nM]$ para epotilona B, $94 - 303 [nM]$ para paclitaxel y $25,6 - 47 [nM]$ para docetaxel, es decir, los valores de K_F obtenidos de la respuesta del sensor estudiado son comparables con las constantes de afinidad reportadas en la literatura para los fármacos utilizados.⁵⁶

⁵⁶ KENJI NAMOTO RUBEN M. BUEY, J.FERNANDO DIAZ, JOS M. ANDREU, AURORA O'BRATE, PARASKEVI GIANNAKAKOU, K.C. NICOLAOU, PRADIP K. SASMAL, ANDREAS RITZÉN. "Interaction of Epothilone Analogs with the Paclitaxel Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization, and Cytotoxicity". En: *Chemistry Biology* 11.2 (2010), págs. 225-236.

⁵⁷ YUN TAO MA y col. "A Series of Enthalpically Optimized Docetaxel Analogues Exhibiting Enhanced Antitumor Activity and Water Solubility". En: *Journal of Natural Products* 81.3 (2018), págs. 524-533.

4. CONCLUSIONES

Se desarrolló un sensor sin etiqueta (*label free*) para cuantificar la interacción de fármacos antimitóticos con β -Tubulina a través de la dureza química η y la dureza química efectiva η_{x-b} , obtenidas experimentalmente por espectroscopia de capacitancia electroquímica. El sensor desarrollado consiste en una celda electroquímica de tres puntas, cuyo electrodo de trabajo está conformado por una monocapa molecular mixta de 11 ferrocenil-1- undecanetiol y ácido 16 mercaptohexadecanoico autoensamblada sobre un sustrato de oro y funcionalizada con β -Tubulina.

Con el sensor desarrollado se cuantificó la interacción de la β -Tubulina con Epotilona B, Paclitaxel y Docetaxel, utilizando dos métodos de calibración diferentes: con dureza química y con dureza química efectiva. En el primer método se definió la respuesta del sensor a una concentración dada de fármaco como la diferencia entre la dureza química medida para dicha concentración y la medida para el blanco $\eta - \eta_b$, los límites de detección calculados respecto a la curva de calibración construida por este métodos fueron $3.25 [\mu M]$ para epotilona B, $4.06 [\mu M]$ para docetaxel y $2.725 [\mu M]$ para paclitaxel.

Se evidenció que la dependencia de la respuesta respecto al blanco afecta negativamente la capacidad de detección del sensor debido a que esta medida está altamente influenciada por las condiciones iniciales de la superficie de interacción, que a su vez representó una de las mayores dificultades experimentales en el desarrollo del sensor, debido especialmente a falta de reproducibilidad causada por factores que no se lograron identificar dentro de las variables controlables del experimento, es de tener en cuenta que las dimensiones de escalas atómicas de estas monocapas moleculares implican la influencia de diversos factores no controlables durante

su formación.

Para el segundo método de calibración se definió la dureza química efectiva η_{x-b} , y se tomó como respuesta del sensor $\eta_{x-b} - \eta_b$, con lo cual se logró reducir la dependencia de la respuesta con el blanco, mejorando la capacidad de detección del sensor. Los límites de calibración calculados en este caso fueron $2.02 [\mu M]$ para epotilona B, $1.55 [\mu M]$ para docetaxel y $0.73 [\mu M]$ para paclitaxel. Adicionalmente los parámetros de las curvas de calibración obtenidos por este método fueron similares para los tres fármacos, teniendo en cuenta que los fármacos utilizados comparten el mismo mecanismo de acción, se puede inferir que la respuesta del sensor definida en función de η_{x-b} está determinada por la naturaleza de la interacción receptor-analito.

Lo anterior sugiere que la dureza química efectiva definida en este trabajo provee una nueva metodología de calibración de sensores que puede ser utilizada para cuantificar diferentes tipos de interacción receptor-analito sin depender de las condiciones de la superficie de interacción, aportando una posible solución a uno de los mayores retos experimentales reportados en el área de bio-reconocimiento.

En cuanto a la afinidad de interacción, se estimaron, por medio de los parámetros de las curvas de calibración obtenidas con η_{x-b} y las isotermas de Freundlich, las constantes de Freundlich para obtenidos para epotilona B, docetaxel y paclitaxel $K_f = 28.2 [nM]$, $K_f = 33.72 [nM]$ y $K_f = 57.93 [nM]$ respectivamente. Estos valores son comparables con las constantes de afinidad reportadas en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-GHOUTI, MOHAMMAD A. y DANA A. DA'ANA. "Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review". En: *Journal of Hazardous Materials* 393 (2020), pág. 122383 (vid. pág. 64).
- ALLEN J. BARD, LARRY R. FAULKNER. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. second. New York: JOHN WILEY & SONS, INC., 2000, págs. 368-414 (vid. págs. 23, 31).
- ATTA-UR-RAHMAN, M.I. CHOUDHARY y W.J THOMSEN. *Bioassay Techniques for Drug Development*. 1.^a ed. CRC Press, 2001 (vid. pág. 18).
- AYAWEI, NIMIBOFA, AUGUSTUS NEWTON EBELEGI y DONBEBE WANKASI. "Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms". En: *Journal of Chemistry* 2017 (2017). DOI: [10.1155/2017/3039817](https://doi.org/10.1155/2017/3039817) (vid. págs. 62, 64).
- BISQUERT, JUAN. *Nanostructured energy devices : equilibrium concepts and kinetics*. 2015, pág. 352 (vid. pág. 59).
- BORYS, FILIP y col. "Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting Microtubule Dynamics in Normal and Cancer Cells". En: *Molecules* 25.16 (2020) (vid. pág. 33).
- BRAY, FREDDIE y col. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". En: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68.6 (2018), págs. 394-424 (vid. pág. 17).

BUENO, PAULO R. "Common Principles of Molecular Electronics and Nanoscale Electrochemistry". En: *Analytical Chemistry* 90.12 (2018), págs. 7095-7106 (vid. pág. 44).

BUENO, PAULO R., GUSTAVO T. FELICIANO y JASON J. DAVIS. "Capacitance spectroscopy and density functional theory". En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17.14 (2015), págs. 9375-9382 (vid. págs. 37, 59, 60).

BUENO, PAULO R. y DAVID A. MIRANDA. "Conceptual density functional theory for electron transfer and transport in mesoscopic systems". En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 19.8 (2017), págs. 6184-6195 (vid. págs. 59, 60, 62, 73).

BUENO, PAULO R., GIULIA MIZZON y JASON J. DAVIS. "Capacitance spectroscopy: A versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers". En: *Journal of Physical Chemistry B* 116.30 (2012), págs. 8822-8829 (vid. pág. 37).

BUENO, TIAGO A. BENITES; WILLIAN C. RIBEIRO; MÁRCIO S. GÓES; ANTONIO A. P. FERREIRAI; PAULO R. "Efeitos da Rugosidade Superficial nas Propriedades de Passivação de Monocamadas Orgânicas Automontadas". En: *Quim. Nova* 37.9 (2014), págs. 1533-1537 (vid. págs. 24, 26).

BÜRGI, THOMAS. "Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters". En: *Nanoscale* 7.38 (2015), págs. 15553-15567 (vid. pág. 23).

CHEETHAM, PHILIPPA y DANIEL P. PETRYLAK. "Tubulin-targeted agents including docetaxel and cabazitaxel". En: *Cancer Journal (United States)* 19.1 (2013), págs. 59-65 (vid. págs. 33, 76).

COLORADO, R. y T.R. LEE. "Thiol-based Self-assembled Monolayers: Formation and Organization". En: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Ed. por K.H. Jürgen Buschow y col. Oxford: Elsevier, 2001, págs. 9332 -9344 (vid. págs. 23, 24).

DHANDAPAN, MUTHU y AARON GOLDMAN. "Preclinical Cancer Models and Biomarkers for Drug Development: New Technologies and Emerging Tools". En: *J Mol Biomark Diagn* 8.5 (2017), págs. 1-8 (vid. págs. 17, 18).

FERNANDES, FLÁVIO C.B. y col. "Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures". En: *Biosensors and Bioelectronics* 57 (2014), págs. 96-102 (vid. págs. 25, 37, 38, 72).

FERRETTI, SILVIA y col. "Self-assembled monolayers: A versatile tool for the formulation of bio- surfaces". En: *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 19.9 (2000), págs. 530-540 (vid. pág. 22).

FIELD, JESSICA J., JOSÉ FERNANDO DÍAZ y JOHN H. MILLER. "The binding sites of microtubule-stabilizing agents". En: *Chemistry and Biology* 20.3 (2013), págs. 301-315 (vid. págs. 35, 36).

FISCHER, MARCEL J E. "Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach." En: *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols* (2010), pág. 255 (vid. pág. 36).

FOSTER, IRENE. "Cancer: A cell cycle defect". En: *Radiography* 14.2 (2008), págs. 144-149 (vid. pág. 17).

FREEDMAN, HOLLY y col. "Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isoty-

- pe binding selectivity". En: *Journal of Chemical Information and Modeling* 49.2 (2009), págs. 424-436 (vid. pág. 35).
- HAMELIN, A. y A. M. MARTINS. "Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 2. Behaviour of high-index faces". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 407.1-2 (1996), págs. 13-21 (vid. págs. 28, 30).
- HIRATA, NAOYUKI y col. "Excited electron dynamics at ferrocene-terminated self-assembled monolayers on Au(1 1 1): Lengthened lifetime of image potential state". En: *Chemical Physics Letters* 561-562 (2013), págs. 131-136 (vid. págs. 23, 32).
- HUDARI, FELIPE F. y col. "Reagentless Detection of Low-Molecular-Weight Triamterene Using Self-Doped TiO₂ Nanotubes". En: *Analytical Chemistry* 90.12 (2018), págs. 7651-7658 (vid. págs. 27, 72).
- HULME, EDWARD C. y MIKE A. TREVETHICK. "Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation". En: *British Journal of Pharmacology* 161.6 (2010), págs. 1219-1237 (vid. pág. 19).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Cancer Tomorrow*. 2020 (vid. pág. 17).
- JORDAN, MARY ANN y LESLIE WILSON. "Microtubules as a target for anticancer drugs". En: *Nature Reviews Cancer* 4.4 (2004), págs. 253-265 (vid. págs. 18, 33, 36).
- KARTHIKEYAN, SUBRAMANI y col. "Exploring the Binding Interaction Mechanism of Taxol in β -Tubulin and Bovine Serum Albumin: A Biophysical Approach". En: *Molecular Pharmaceutics* 16.2 (2019), págs. 669-681 (vid. págs. 35, 43).

- KENAKIN, T. *A Pharmacology Primer: Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery*. Elsevier Science, 2018 (vid. págs. 19, 63, 78).
- LEHR, JOSHUA y col. "Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy". En: *Analytical Chemistry* 86.5 (2014), págs. 2559-2564 (vid. págs. 38, 43).
- LI, JIE JACK. *Top Drugs: Their History, Pharmacology, and Syntheses*. New York: Oxford University Press, 2015 (vid. pág. 18).
- LONG, GARY L y J D WINEFORDNER. "Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition". En: *Anal. Chim. Acta* 55.7 (1983) (vid. págs. 65, 66, 74).
- MA, YUN TAO y col. "A Series of Enthalpically Optimized Docetaxel Analogues Exhibiting Enhanced Antitumor Activity and Water Solubility". En: *Journal of Natural Products* 81.3 (2018), págs. 524-533 (vid. pág. 79).
- MAKOV, GUY. "Chemical Hardness in Density Functional Theory". En: *The Journal of Physical Chemistry* 99.23 (1995), págs. 9337-9339. DOI: 10.1021/j100023a006 (vid. pág. 19).
- MAKSYMОВYCH, PETER y col. "Gold adatom as a key structural component in self-assembled monolayers of organosulfur molecules on Au(1 1 1)". En: *Progress in Surface Science* 85.5-8 (2010), págs. 206-240 (vid. pág. 23).
- MIRANDA, DAVID A. y PAULO R. BUENO. "Chemical Hardness of Mesoscopic Electrochemical Systems Directly Analyzed from Experimental Data". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 123.34 (2019), págs. 21213-21223 (vid. págs. 59, 60, 62, 73).

- MIRANDA, DAVID A. y PAULO R. BUENO. "Density functional theory and an experimentally-designed energy functional of electron density". En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18.37 (2016), págs. 25984-25992 (vid. págs. 19, 38, 61, 62).
- MUSCAT, A. J. *Self-assembly of functionalized organic molecules on flat solid surfaces*. Elsevier, 2018, págs. 810-816 (vid. pág. 21).
- NETTLES, JAMES H. y col. "The binding mode of epothilone A on α,β -tubulin by electron crystallography". En: *Science* 305.5685 (2004), págs. 866-869 (vid. pág. 36).
- ORR, GEORGE A. y col. "Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules". En: *Oncogene* 22.47 REV. ISS. 6 (2003), págs. 7280-7295 (vid. pág. 34).
- PARKHEY, PIYUSH y S. VENKATA MOHAN. *Biosensing applications of microbial fuel cell: Approach toward miniaturization*. Elsevier B.V., 2018, págs. 977-997 (vid. pág. 21).
- PARR, ROBERT G. y RALPH G. PEARSON. "Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity". En: *Journal of the American Chemical Society* 105.26 (1983), págs. 7512-7516 (vid. pág. 61).
- PATEL, NIKIN y col. "Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers". En: *Langmuir* 13.24 (1997), págs. 6485-6490 (vid. pág. 36).
- PEARSON, RALPH G. "Chemical hardness and density functional theory". En: *Journal of Chemical Sciences* 117.5 (2005), págs. 369-377 (vid. pág. 61).
- RANADE, ADWAIT R y col. "Characterizing the Epothilone Binding Site on β -Tubulin by Photoaffinity Labeling: Identification of β -Tubulin Peptides TARGSQY and

- TSRGSQQY as Targets of an Epothilone Photoprobe for Polymerized Tubulin”. En: *J.MEd Chem* 59.7 (2017), págs. 3499-3514 (vid. págs. 35, 43).
- REIF, F. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. Waveland Press, 2009 (vid. pág. 58).
- RUBEN M. BUEY, J.FERNANDO DIAZ, JOS M. ANDREU, AURORA O’BRATE, PARASKEVI GIANNAKAKOU, K.C. NICOLAOU, PRADIP K. SASMAL, ANDREAS RITZÉN, KENJI NAMOTO. “Interaction of Epothilone Analogs with the Paclitaxel-Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization, and Cytotoxicity”. En: *Chemistry Biology* 11.2 (2010), págs. 225-236 (vid. pág. 78).
- SANTOS, ADRIANO y PAULO R. BUENO. “Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface”. En: *Biosens. Bioelectron.* 83 (2016), págs. 368-378 (vid. págs. 31, 64).
- SANTOS, ADRIANO y col. “Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity”. En: *Biosensors and Bioelectronics* 62 (2014), págs. 102-105 (vid. pág. 37).
- SINGH, MANDEEP, NAVPREET KAUR y ELISABETTA COMINI. “The role of self-assembled monolayers in electronic devices”. En: *Journal of Materials Chemistry C* 8.12 (2020), págs. 3938-3955 (vid. pág. 21).
- THOMAS, MICHAEL S.C. y CATHY ROGERS. “Education, the science of learning, and the COVID-19 crisis”. En: *Prospects* 0123456789 (2020), págs. 1-4 (vid. pág. 17).

TRASATTI, S. y O. A PETRII. "Real surface area measurements in electrochemistry".

En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 327.1-2 (1992), págs. 353-376 (vid. págs. 26, 29).

TRZASKOWSKI, BARTOSZ y col. "Modeling Tubulin at Interfaces. Immobilization of Microtubules on Self-Assembled Monolayers". En: *The Journal of Physical Chemistry B* 109.37 (2005), págs. 17734-17742 (vid. pág. 36).

VELA-CORCÍA, DAVID y col. "Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance". En: *Scientific Reports* 8.1 (2018), pág. 7161 (vid. pág. 33).

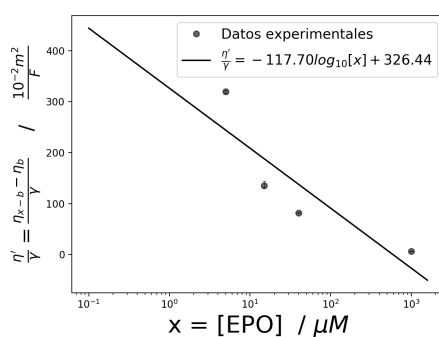
XU, XINGXING y col. "Revisiting the factors influencing gold electrodes prepared using cyclic voltammetry". En: *Sensors and Actuators, B: Chemical* 283 (2019), págs. 146-153 (vid. pág. 28).

ZHANG, ZHIYUAN y col. "The electron density delocalization of hydrogen bond systems". En: *Advances in Physics: X* 3.1 (2018), págs. 298-315 (vid. pág. 43).

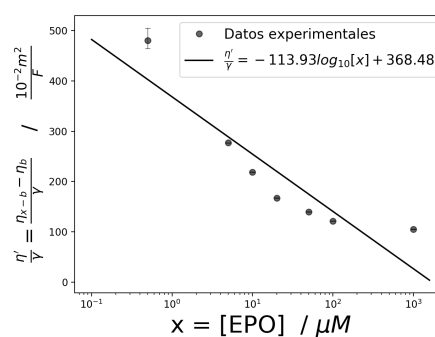
ANEXOS

Anexo A. Dureza química efectiva de fármacos taxanos. Curvas de calibración

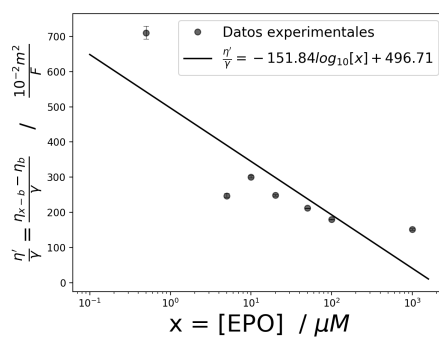
Las figuras (28), (24) y (25) presentan las curvas de calibración η' Vs $\text{Log}[x]$, para cada uno de los experimentos independientes realizados con Eptilona B, Docetaxel y Paclitaxel respectivamente.



(d) Experimento 1

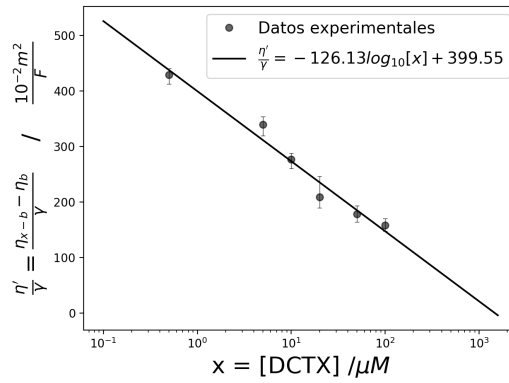


(e) Experimento 2

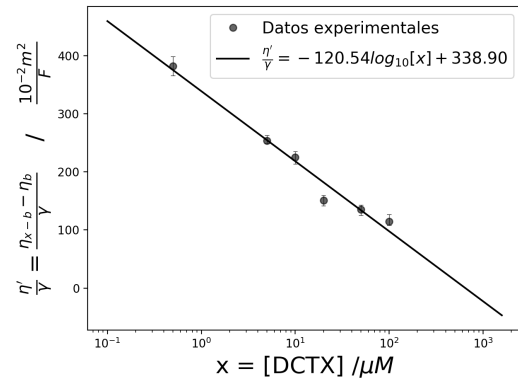


(f) Experimento 3

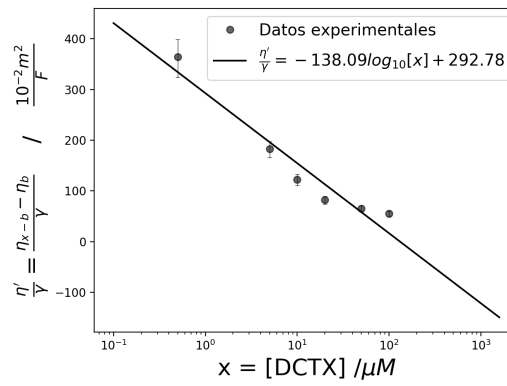
Figura 23. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de Eptilona B, $[EPO]$.



(a) Experimento 1

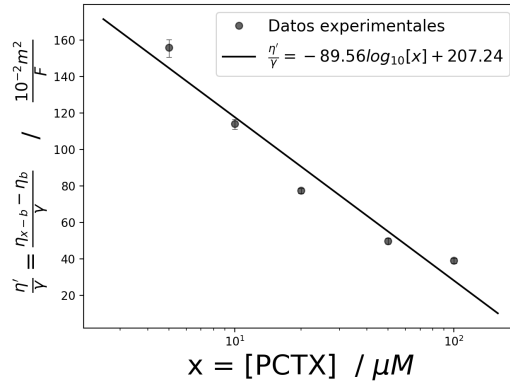


(b) Experimento 2

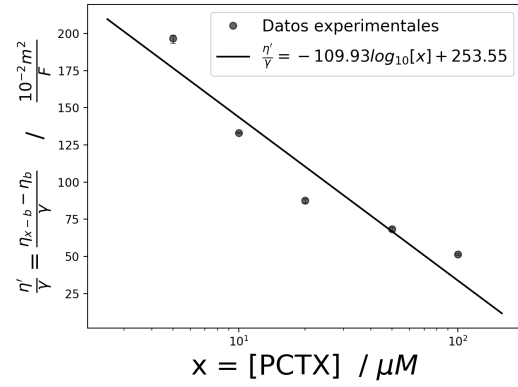


(c) Experimento 3

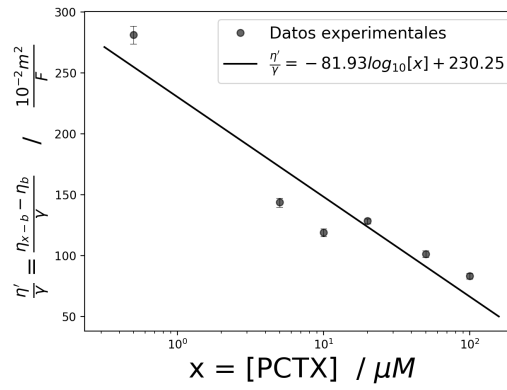
Figura 24. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de docetaxe, $[DCTX]$.



(a) Experimento 1



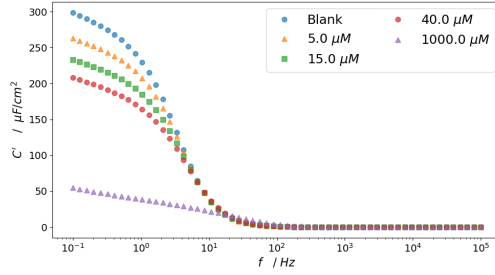
(b) Experimento 2



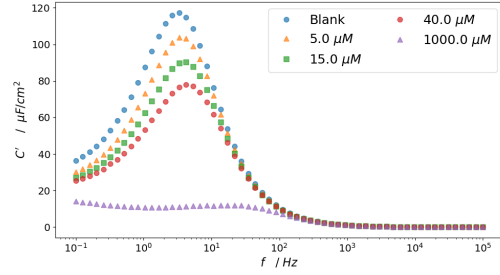
(c) Experimento 3

Figura 25. Curvas de calibración usando como respuesta del sensor la dureza química efectiva η' en función del logaritmo de la concentración de Paclitaxel, $[PCTX]$.

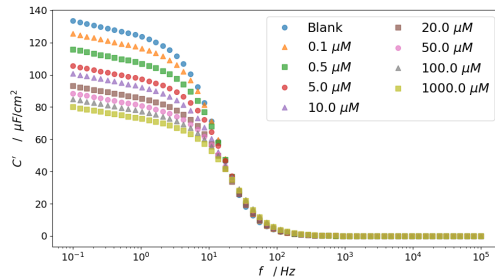
Anexo B. Diagramas de Bode de capacitancia real C' e imaginaria C''



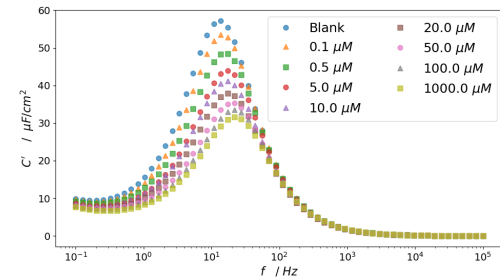
(a)



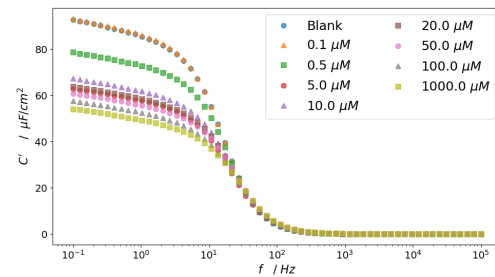
(b)



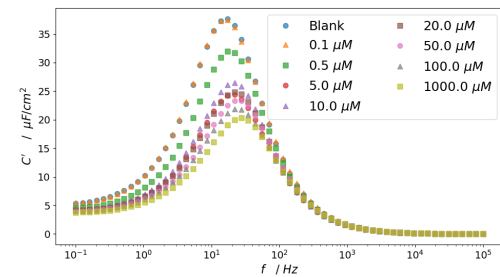
(c)



(d)

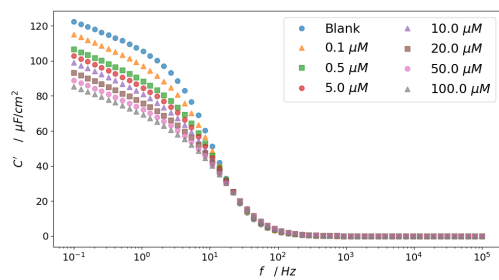


(e)

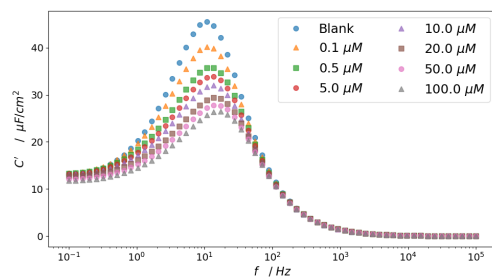


(f)

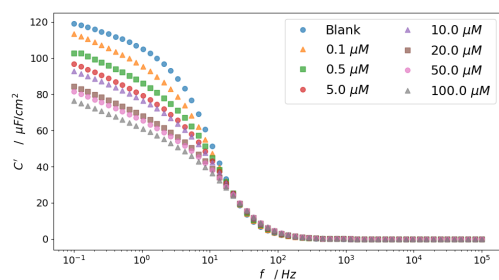
Figura 26. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria, C'' Vs f , para los experimentos realizados con epotilona B, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3.



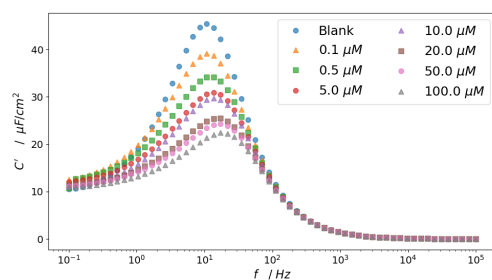
(a)



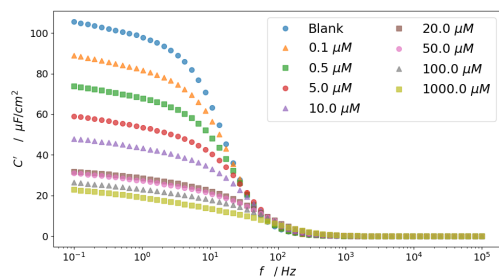
(b)



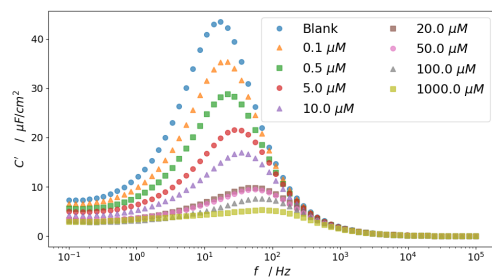
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 27. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria, C'' Vs f , para los experimentos realizados con docetaxel, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3.

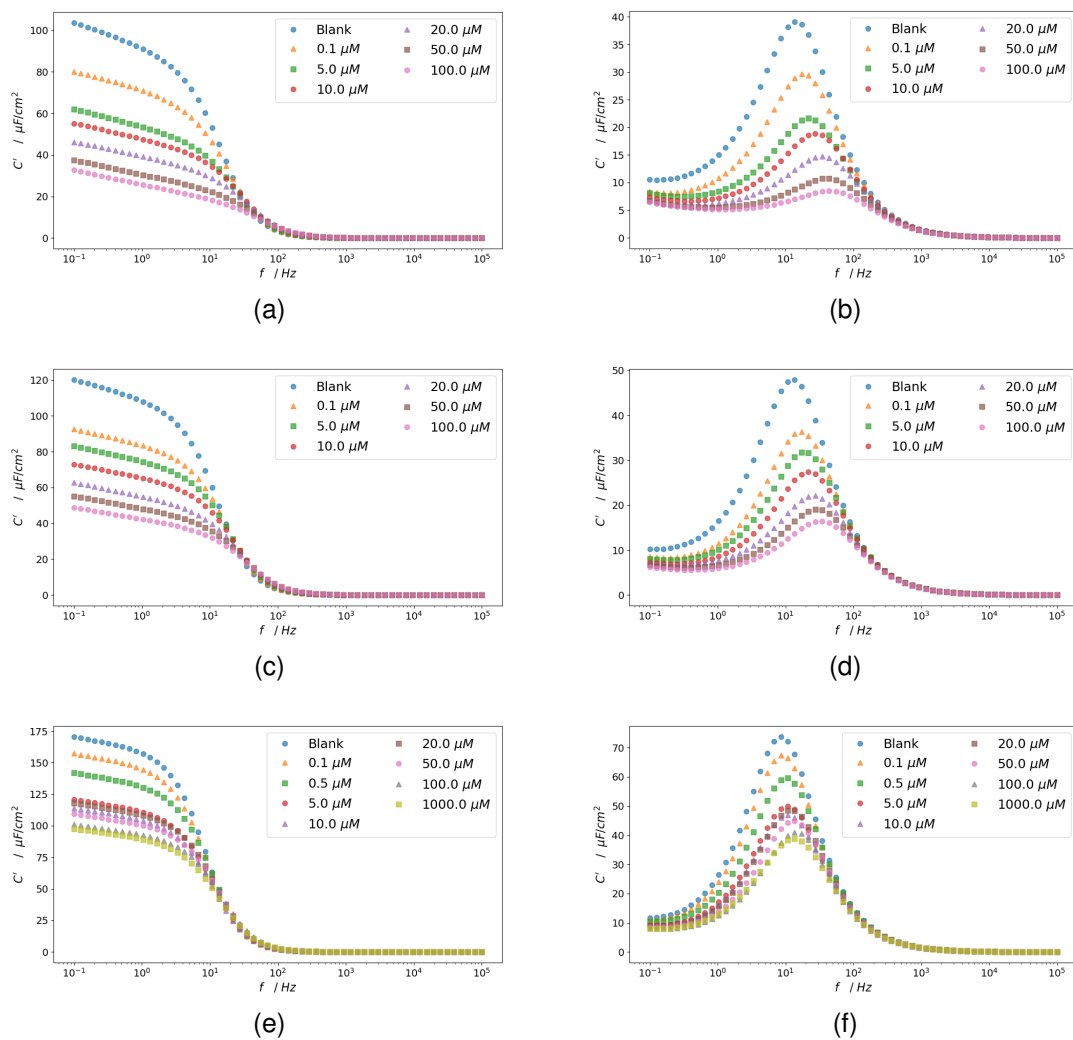


Figura 28. Diagramas de Bode de capacitancia real, C' Vs f , e imaginaria, C'' Vs f , para los experimentos realizados con paclitaxel, (a) y (b) experimento 1, (c) y (d) experimento 2, (e) y (f) experimento 3.

Anexo C. Jupiter Notebook para el análisis de datos

Data_analysis_by_hardness_analytics

January 25, 2021

0. Preparación del entorno de trabajo

La siguiente celda permite, si este Notebook se ejecuta desde Colab, inicializar el entorno de ejecución en un servidor de Collaboratory Lab de Google. Sin embargo, si se ejecuta localmente, permite omitir la ejecución de la celda. De esta manera, este Notebook puede ser ejecutado en un entorno local o en Colab.

```
[1]: try: # Esto permite ejecución en ambiente local, sin afectar el uso en Colab
      from google.colab import drive
      drive.mount('/content/drive')
      basePath = '/content/drive/My Drive/Colab_SandraCorzo'
      %cd $basePath
    except:
      pass
```

```
[2]: import sys
      import numpy as np
      import matplotlib.pyplot as plt
      import pandas as pd

      sys.path.append('../scripts')

      config = {
          'bitacora_path': '../datos/Bitacora.xlsx',
          'experiment_labels': {
              'column_name': 'experimento',
              'voltamperometry': 'CV',
              'impedance': 'CEC'
          },
          'sample_labels': {
              'column_name': 'target',
          },
          'date_labels': {
              'column_name': 'fecha'
          }
      }
```

```
[3]: date = np.datetime64('2019-07-24')
      date1 = np.datetime64('2019-07-25')
```

```

experimental_parameters_paclitaxel = {
    'sample_name': 'Paclitaxel',
    'impedance_blank_label_templates': {
        'default': 'lanco3_%s.txt',
        date      : 'lanco3_%s.txt',
        date1     : 'lanco3_%s.txt'
    },
    'impedance_experiment_label_templates': {
        'default': ['Blanco3_%d.txt', 'PCLTX01uM_%d.txt', 'PCLTX05uM_%d.
↪txt', 'PCLTX5uM_%d.txt', 'PCLTX10uM_%d.txt', 'PCLTX20uM_%d.txt',
↪'PCLTX50uM_%d.txt', 'PCLTX100uM_%d.txt', 'PCLTX1mM_%d.txt'],
        date : ['Blanco3_%d.txt', 'PCLTX01uM_%d.txt', 'PCLTX5uM_%d.txt',
↪'PCLTX10uM_%d.txt', 'PCLTX20uM_%d.txt', 'PCLTX50uM_%d.txt', 'PCLTX100uM_%d.
↪txt'],
        date1 : ['Blanco3_%d.txt', 'PCLTX01uM_%d.txt', 'PCLTX5uM_%d.txt',
↪'PCLTX10uM_%d.txt', 'PCLTX20uM_%d.txt', 'PCLTX50uM_%d.txt', 'PCLTX100uM_%d.
↪txt']
    },
    'impedance_experiment_index':{
        'default': [0, 1, 2],
        date      : [0, 1, 2],
        date1     : [0, 1, 2]
    },
    'impedance_data_labels': {
        'real': u"C' (F)",
        'imag': u"C'' (F)",
        'freq' : u'Frequency (Hz)',
        'phase' : u'-Phase (°)',
        'time' : u'Time (s)'
    }
}

```

```

[4]: date = np.datetime64('2019-08-06')
date1 = np.datetime64('2019-08-07')
experimental_parameters_Docetaxel = {
    'sample_name': 'Docetaxel',
    'impedance_blank_label_templates': {
        'default': 'lanco3_%s.txt',
        date      : 'lanco_3_%s.txt',
        date1     : 'lanco3_%s.txt'
    },
    'impedance_experiment_label_templates': {
        'default' : ['Blanco3_%d.txt', 'DCTX_01uM_%d.txt', 'DCTX_05uM_%d.
↪txt', 'DCTX_5uM_%d.txt', 'DCTX_10uM_%d.txt',
↪'DCTX_20uM_%d.txt', 'DCTX_50uM_%d.txt', 'DCTX_100uM_%d.txt',
↪'DCTX_1mM_%d.txt'],

```

```

    date1      : ['Blanco3_%d.txt', 'DCTXLO1u_%d.txt', 'DCTXLO5u_%d.
→txt', 'DCTXL5u_%d.txt', 'DCTXL10u_%d.txt', 'DCTXL20u_%d.txt',
                  'DCTXL50u_%d.txt', 'DCTXL100u_%d.txt'],
    date       : ['Blanco_3_%d.txt', 'DCTXLO1uM_%d.txt', 'DCTXLO5uM_%d.
→txt', 'DCTXL5uM_%d.txt', 'DCTXL10uM_%d.txt', 'DCTXL20uM_%d.txt',
                  'DCTXL50uM_%d.txt', 'DCTXL100uM_%d.txt']
},
'impedance_experiment_index':{
    'default': [0, 1, 2],
    date      : [0, 1, 2],
    date1     : [0, 1, 2]
},
'impedance_data_labels': {
    'real': u"C' (F)",
    'imag': u"C'' (F)",
    'freq' : u'Frequency (Hz)',
    'phase' : u'-Phase (°)',
    'time' : u'Time (s)'
}
}

```

```

[5]: date = np.datetime64('2019-11-01')
date1 = np.datetime64('2019-11-02')
date2 = np.datetime64('2018-11-20')
experimental_parameters_EpothiloneB = {
    'sample_name': 'EpothiloneB',
    'impedance_blank_label_templates': {
        'default': 'lanco3_%s.txt',
        date      : 'lanco3_%s.txt',
        date1     : 'lanco_3_%s.txt',
        date2     : 'lanco3_%s.txt'
    },
    'impedance_experiment_label_templates':{
        'default': ['Blanco3_%d.txt', 'E5uM_%d.txt', 'E15uM_%d.txt', 'E40uM_%d.
→txt', 'E1mM_%d.txt'],
        date      : ['Blanco3_%d.txt', 'E01uM_%d.txt', 'E05uM_%d.txt', 'E5uM_%d.
→txt', 'E10uM_%d.txt', 'E20uM_%d.txt',
                    'E50uM_%d.txt', 'E100uM_%d.txt', 'E1mM_%d.txt'],
        date1     : ['Blanco_3_%d.txt', 'ECE_Epo_01uM_%d.txt', 'ECE_Epo_05uM_%d.txt',
                    'ECE_Epo_5uM_%d.txt', 'ECE_Epo_10uM_%d.txt', 'ECE_Epo_20uM_%d.
→txt',
                    'ECE_Epo_50uM_%d.txt', 'ECE_Epo_100uM_%d.txt',
→'ECE_Epo_1mM_%d.txt'],
        date2     : ['Blanco3_%s.txt', 'ECE_Epo_5uM_%d.txt', 'ECE_Epo_10uM_%d.
→txt', 'ECE_Epo_15uM_%d.txt', 'ECE_Epo_20uM_%d.txt',
                    'ECE_Epo_100uM_%d.txt', 'ECE_Epo_1mM_%d.txt']
    }
}

```

```

    },
    'impedance_experiment_index':{
        'default': [0, 1, 2],
        'date'    : [1, 2, 3],
        'date1'   : [1, 2, 3],
        'date2'   : [1, 2, 3]
    },
    'impedance_data_labels': {
        'real': u"C' (F)",
        'imag': u"C'' (F)",
        'freq' : u'Frequency (Hz)',
        'phase' : u'-Phase (°)',
        'time'  : u'Time (s)'
    }
}

```

```
[6]: import hardness_analytics as hn
```

```
DCTX = hn.harness_analytics(config, experimental_parameters_Docetaxel)
```

Starting the obtention of impedance data by date ...

Date of the impedance experiments: 2019-08-06

Date of the impedance experiments: 2019-08-07

Date of the impedance experiments: 2019-12-27

Date of the impedance experiments: 2019-12-28

End.

Starting the obtention of the semicircle parameters by date ...

Date of the experiments: 2019-08-06

Date of the experiments: 2019-08-07

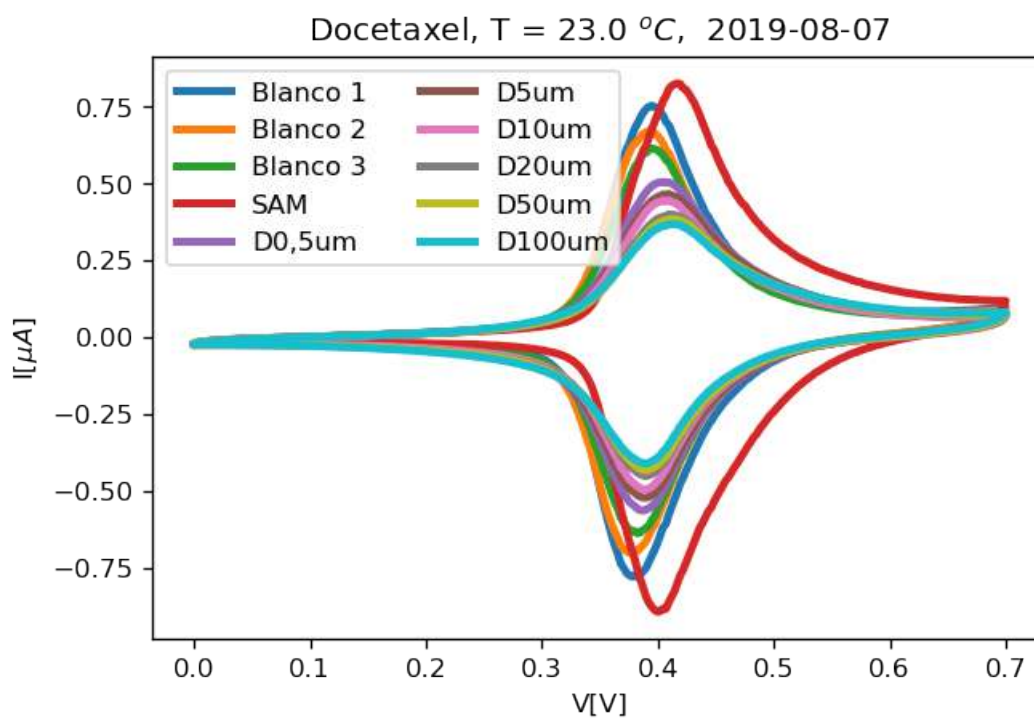
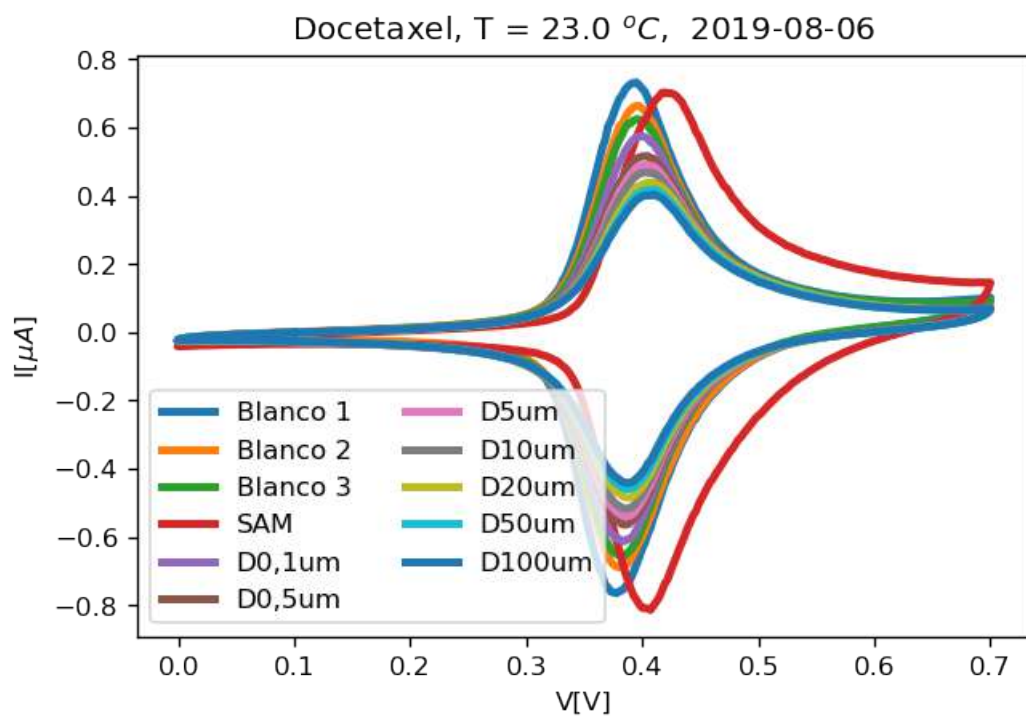
Date of the experiments: 2019-12-27

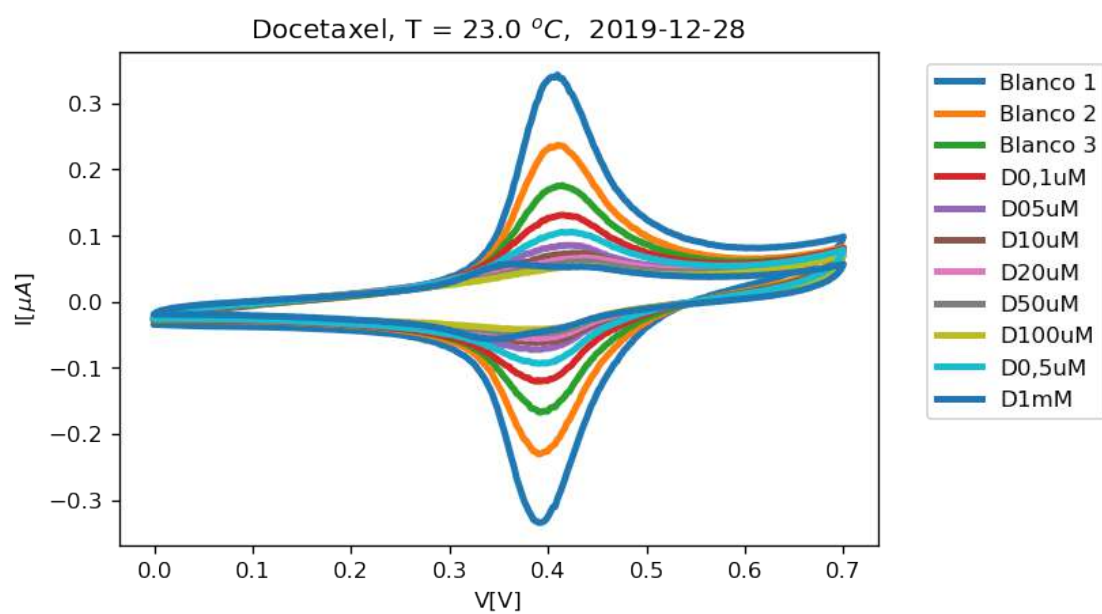
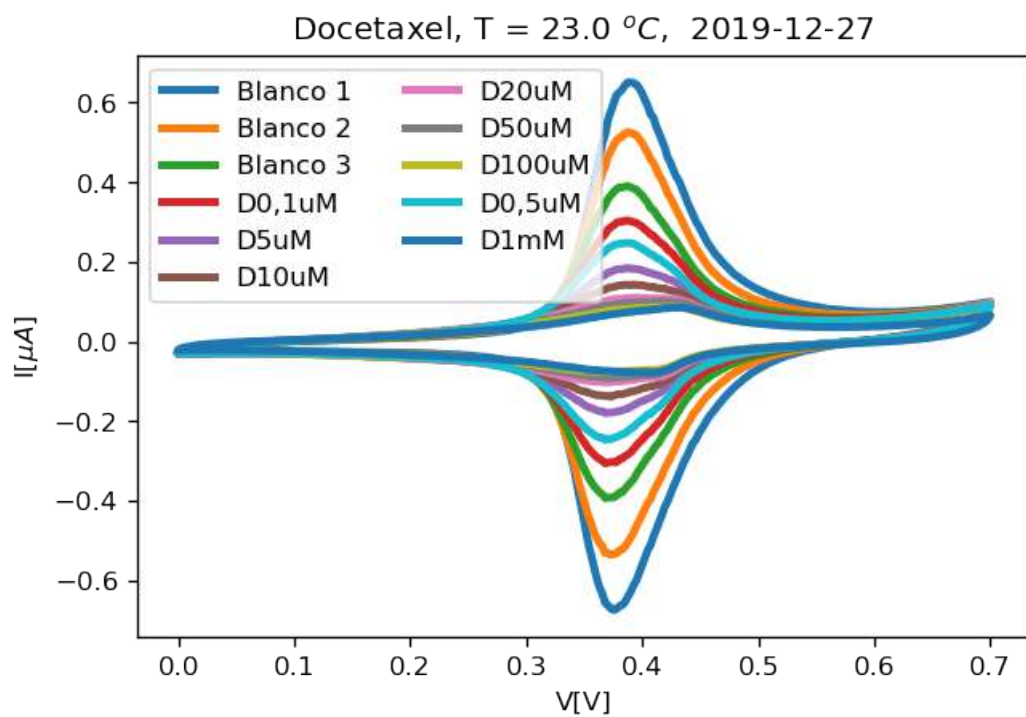
Date of the experiments: 2019-12-28

End.

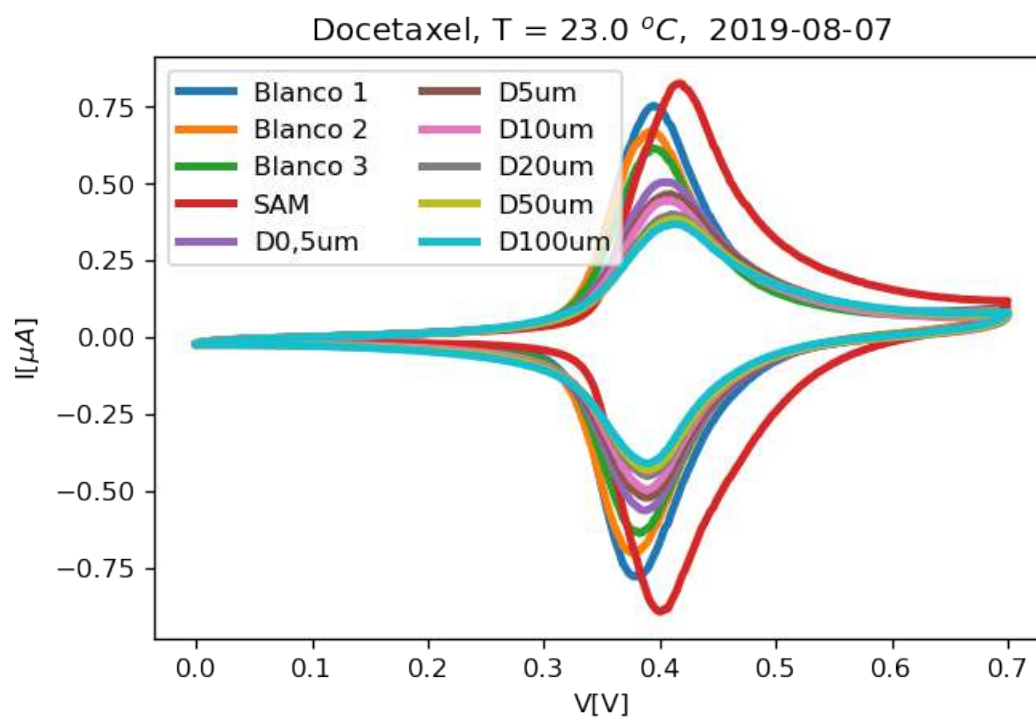
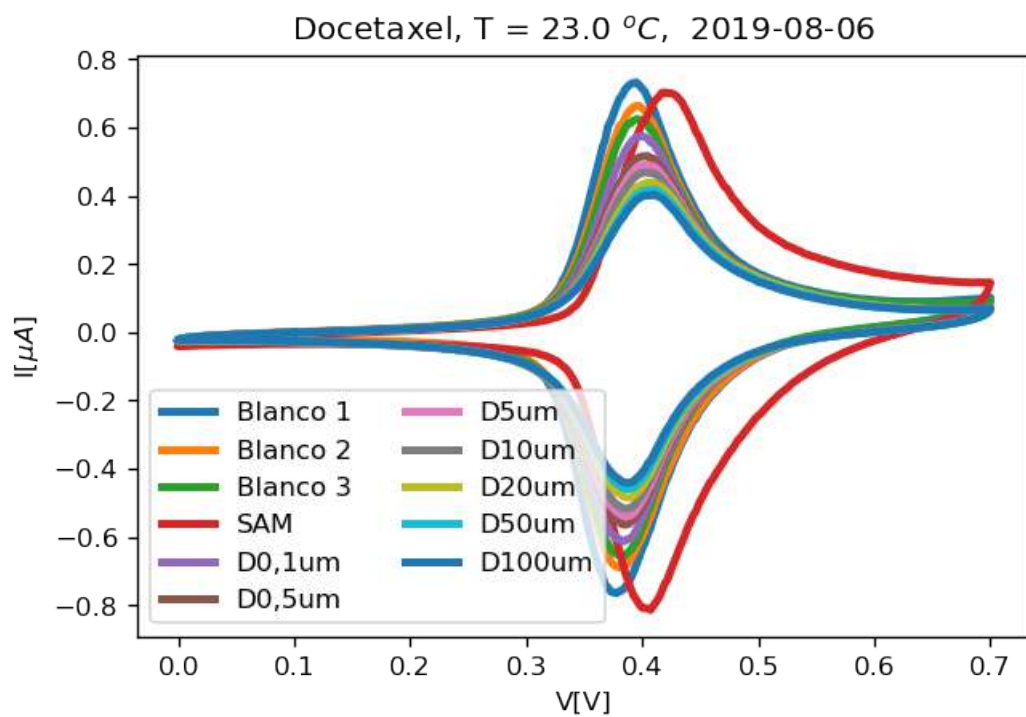
```
[7]: DCTX.plot_voltamperometry_for_all_dates()
plt.legend(bbox_to_anchor=(1.05, 1))
```

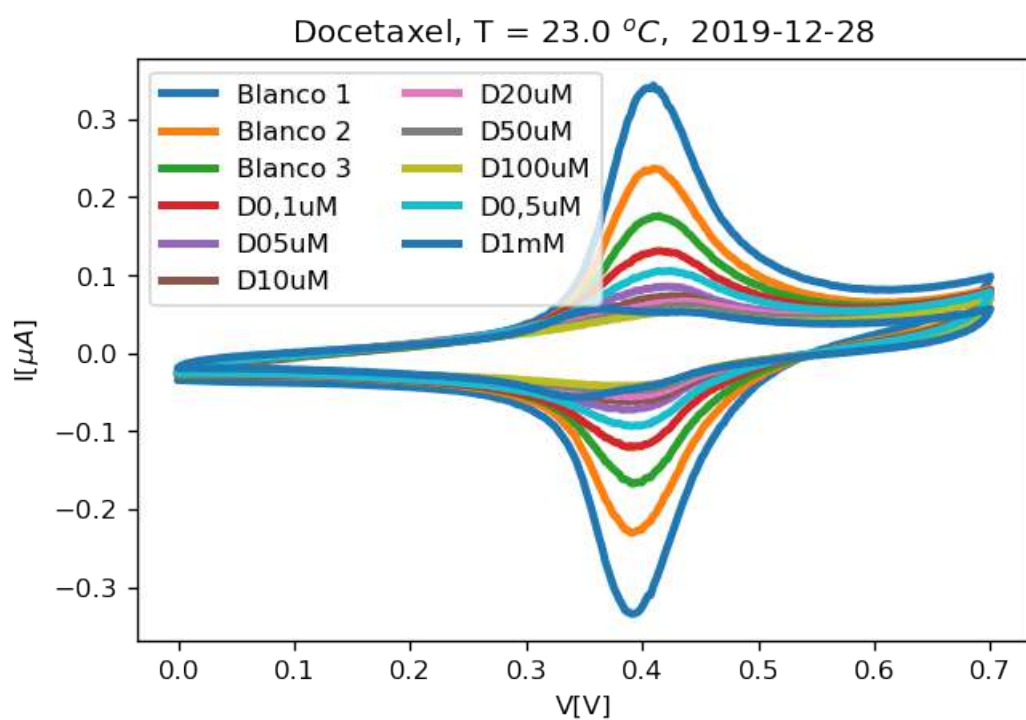
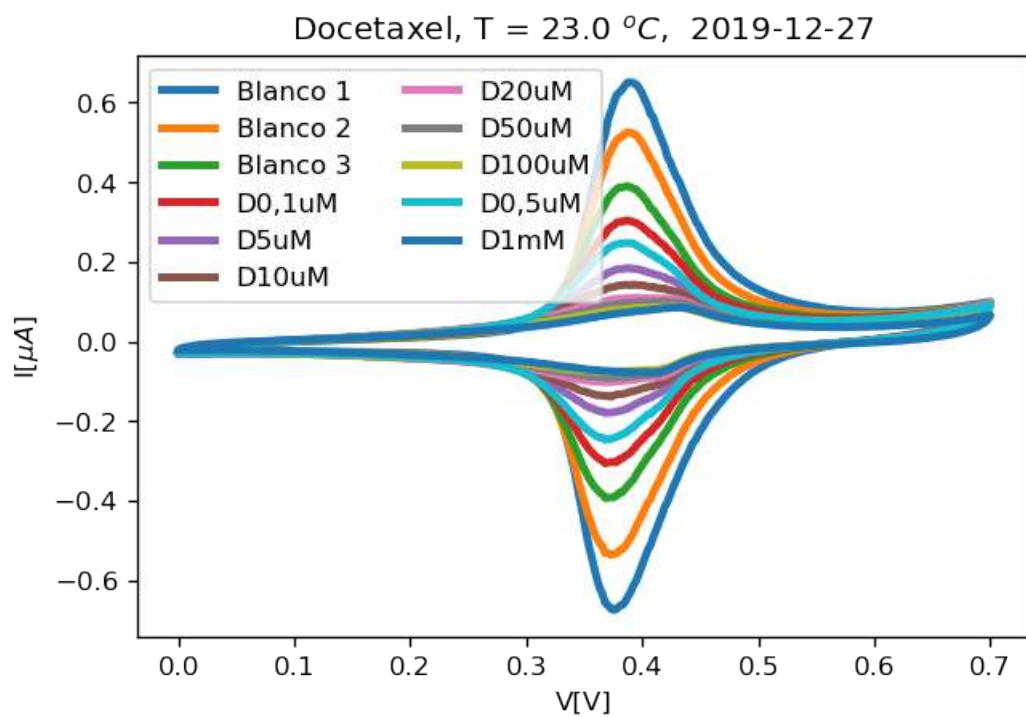
```
[7]: <matplotlib.legend.Legend at 0x1f6ff9b1508>
```





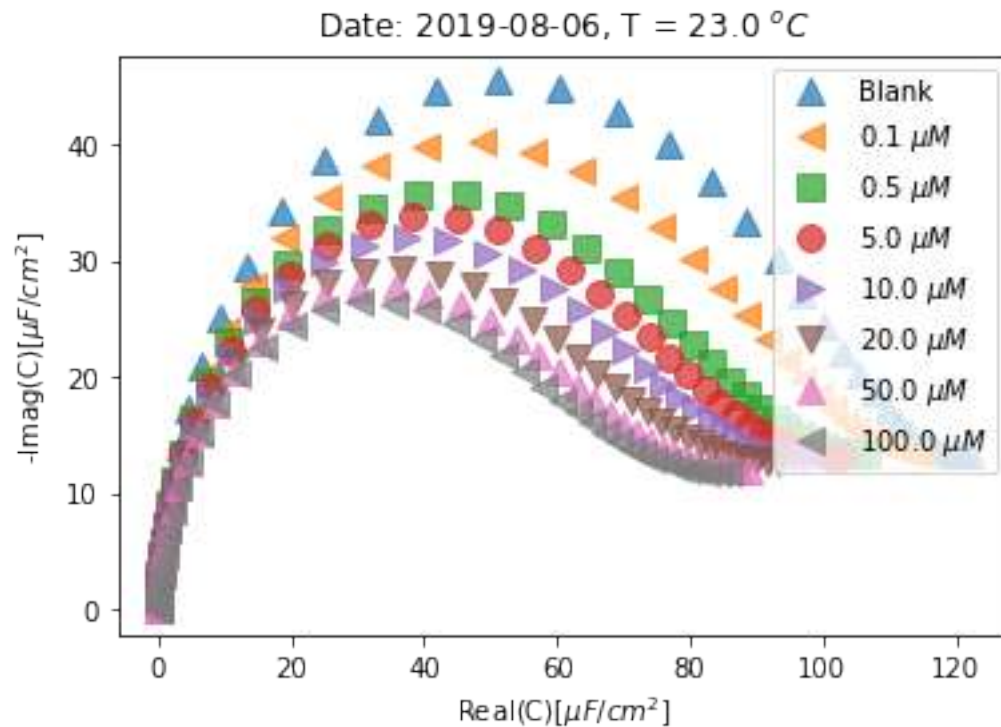
```
[8]: DCTX.plot_voltamperometry_for_all_dates()
```





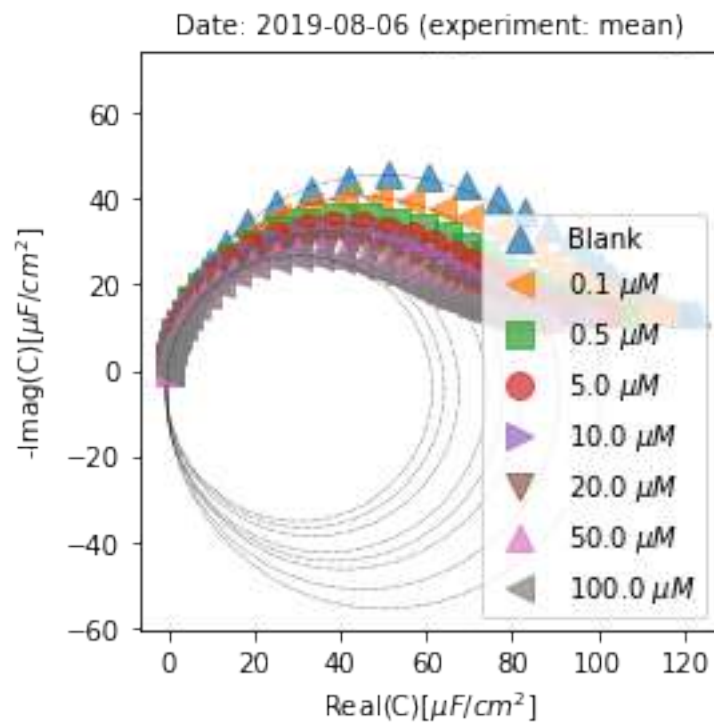
```
[10]: dates = DCTX.get_impedance_dates()
```

```
[11]: #DCTX.plot_all_impedance_data()  
DCTX.plot_impedance_data_by_date(dates[0])
```



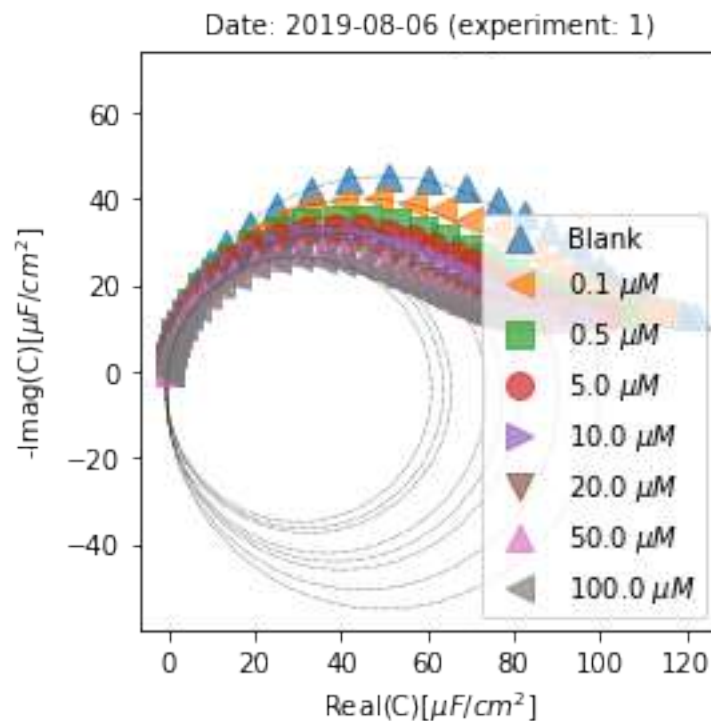
```
[12]: DCTX.plot_impedance_semicircle(dates[0], exp='mean')
```

Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: mean



```
[13]: DCTX.plot_impedance_semicircle(dates[0], exp=1)
```

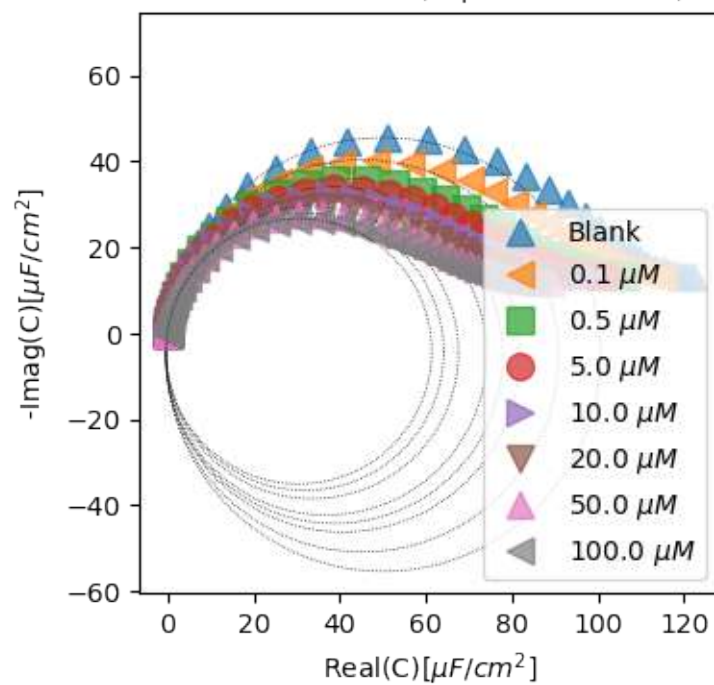
Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 1



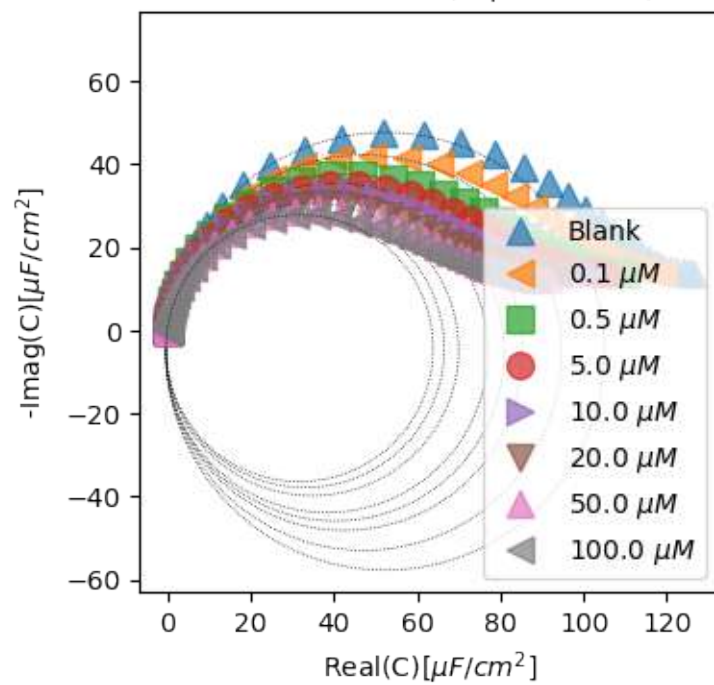
```
[14]: DCTX.plot_N_impedance_semicircles(3)
```

```
Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: mean
Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 0
Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 1
Plotting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 2
Plotting semicircles to date: 2019-08-07 . Experiment: mean
Plotting semicircles to date: 2019-08-07 . Experiment: 0
Plotting semicircles to date: 2019-08-07 . Experiment: 1
Plotting semicircles to date: 2019-08-07 . Experiment: 2
Plotting semicircles to date: 2019-12-27 . Experiment: mean
Plotting semicircles to date: 2019-12-27 . Experiment: 0
Plotting semicircles to date: 2019-12-27 . Experiment: 1
Plotting semicircles to date: 2019-12-27 . Experiment: 2
Plotting semicircles to date: 2019-12-28 . Experiment: mean
Plotting semicircles to date: 2019-12-28 . Experiment: 0
Plotting semicircles to date: 2019-12-28 . Experiment: 1
Plotting semicircles to date: 2019-12-28 . Experiment: 2
```

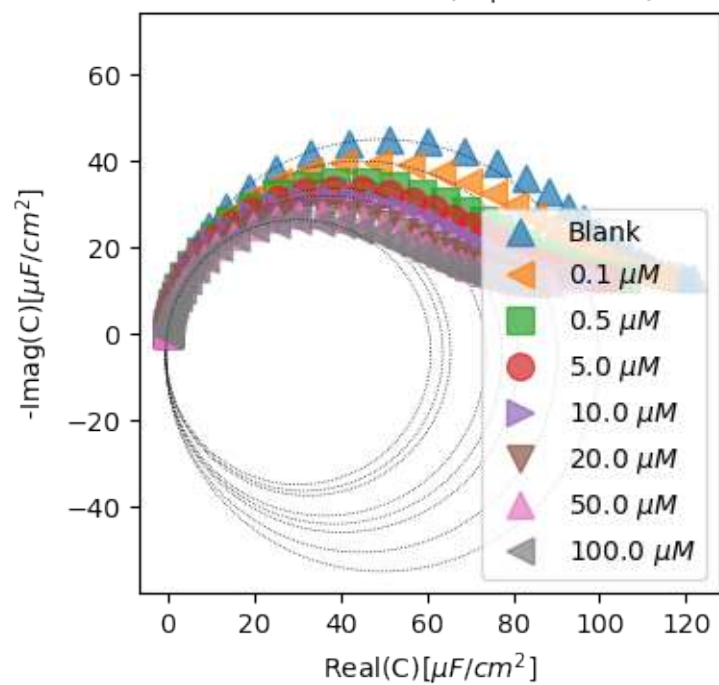
Date: 2019-08-06 (experiment: mean)



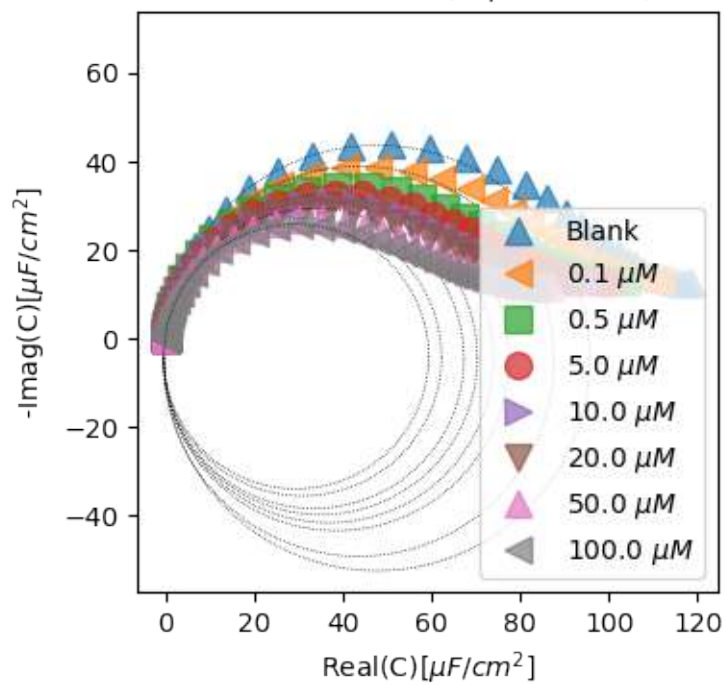
Date: 2019-08-06 (experiment: 0)



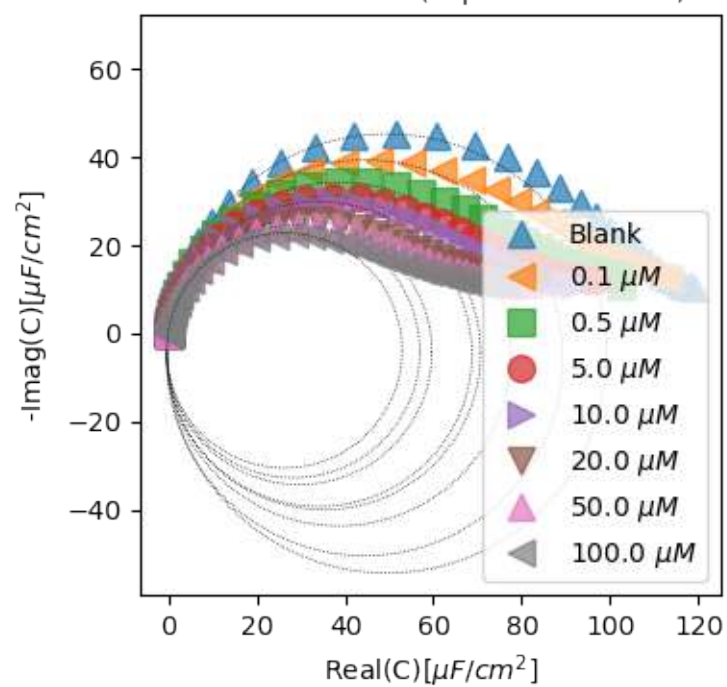
Date: 2019-08-06 (experiment: 1)



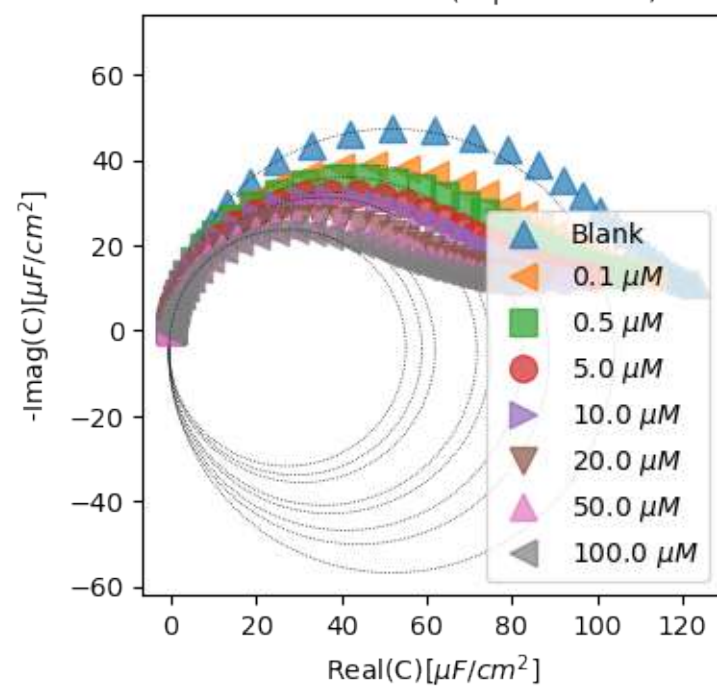
Date: 2019-08-06 (experiment: 2)



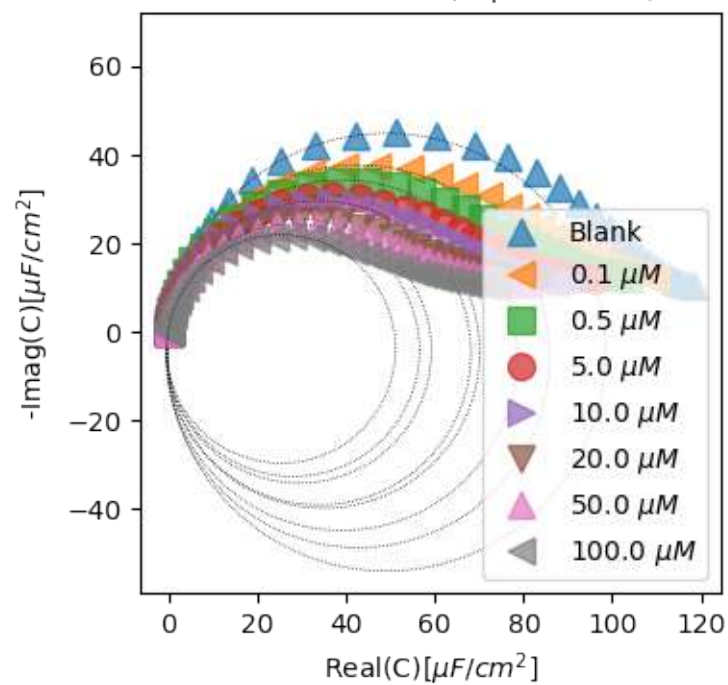
Date: 2019-08-07 (experiment: mean)



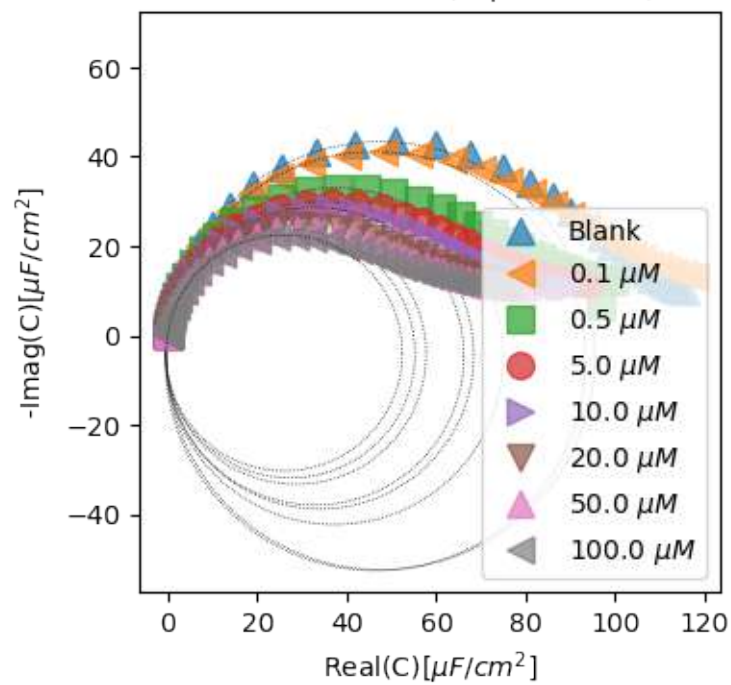
Date: 2019-08-07 (experiment: 0)

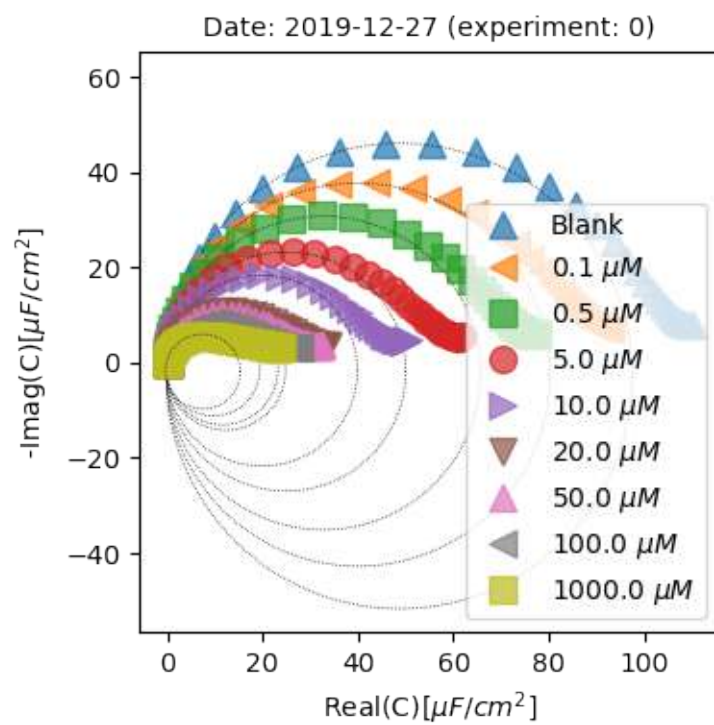
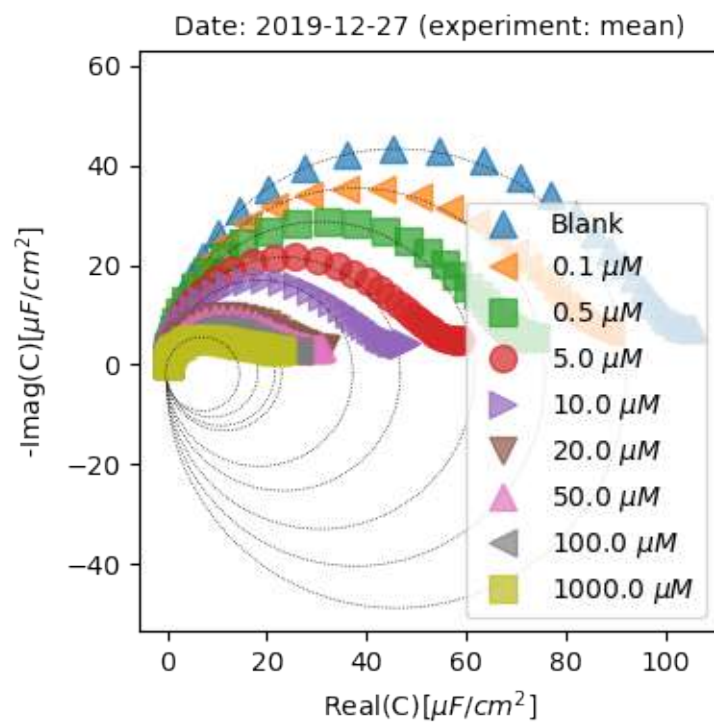


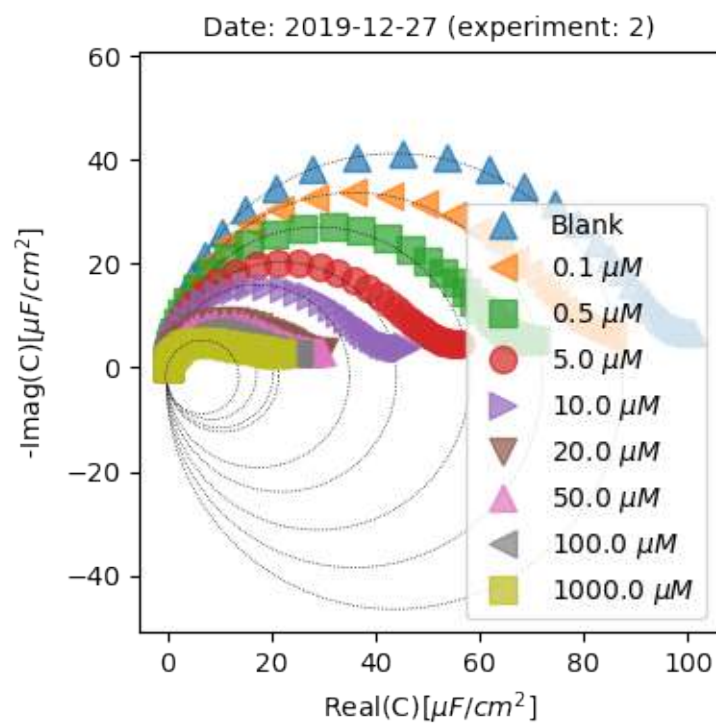
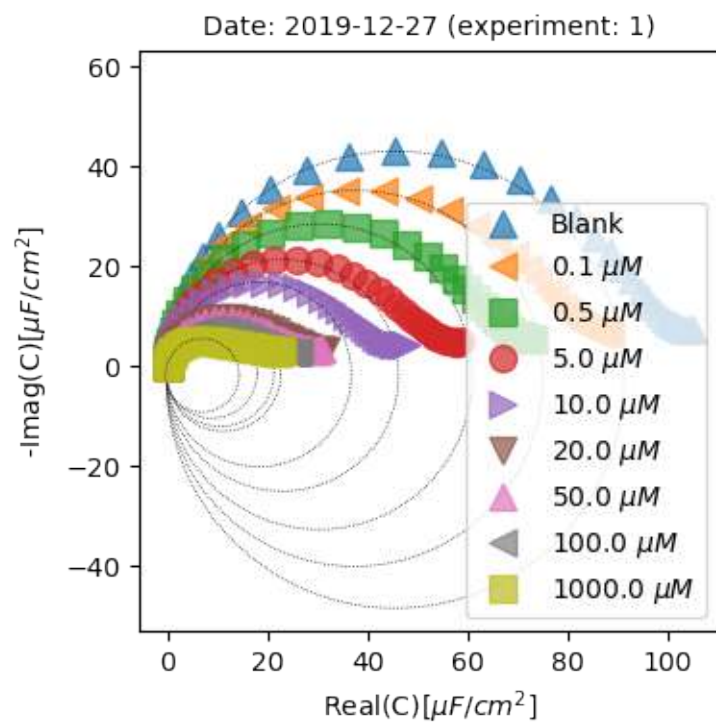
Date: 2019-08-07 (experiment: 1)

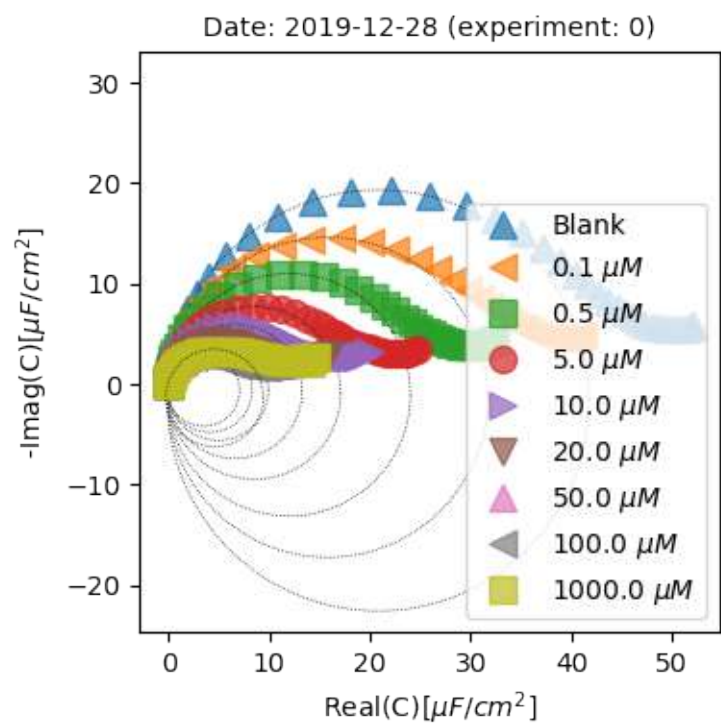
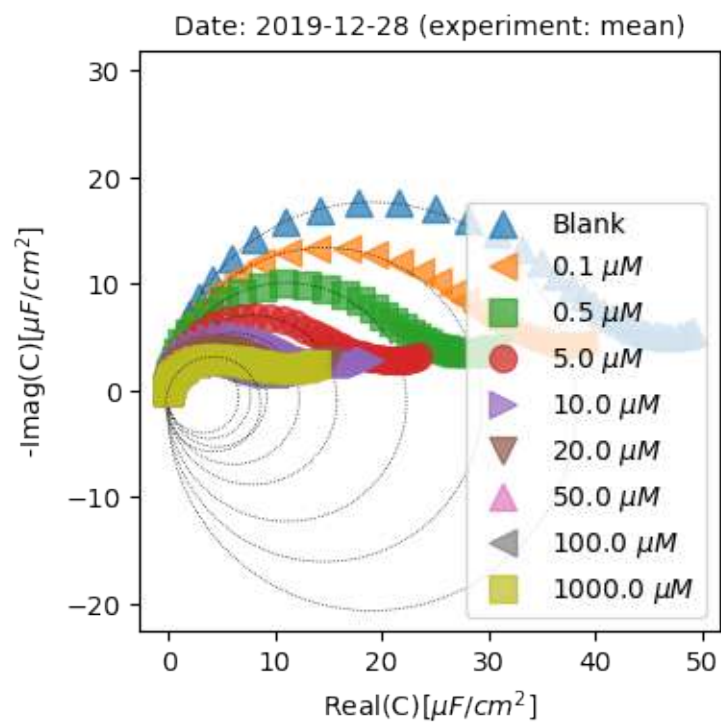


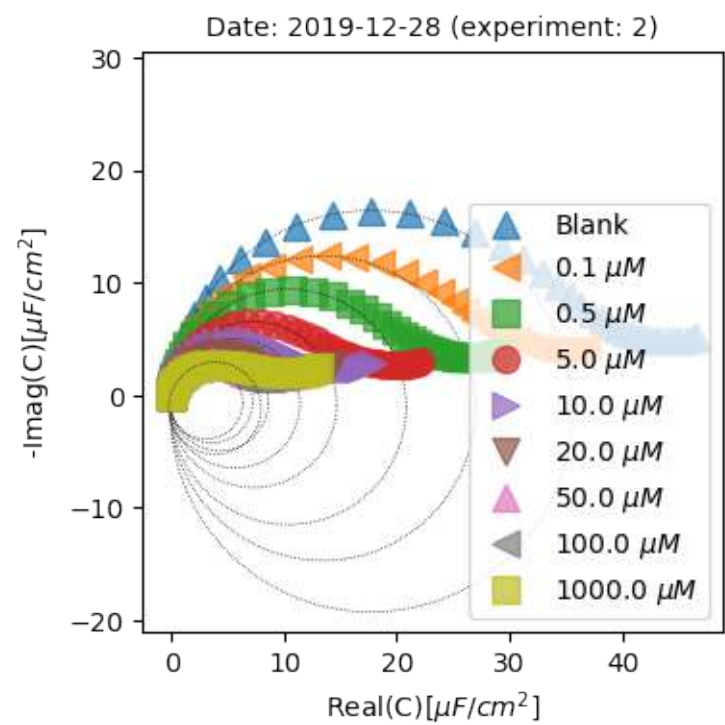
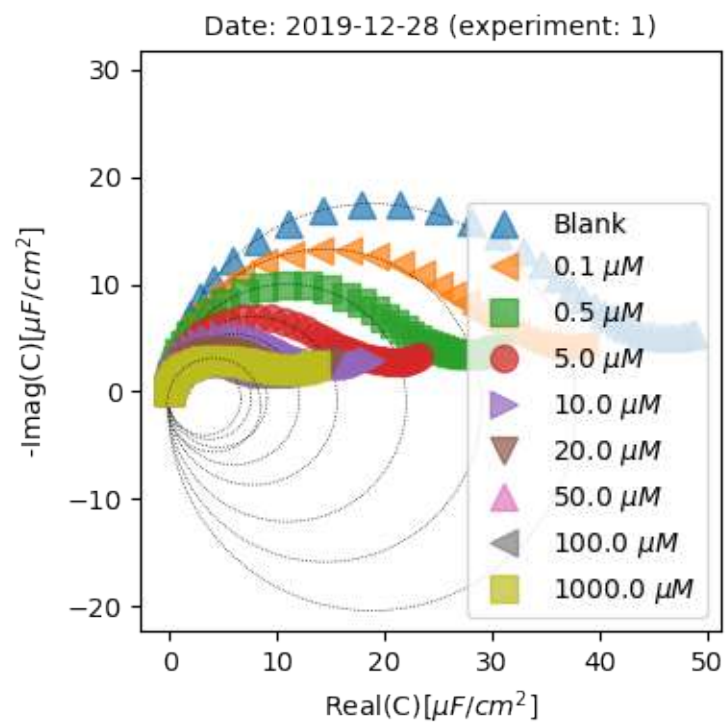
Date: 2019-08-07 (experiment: 2)





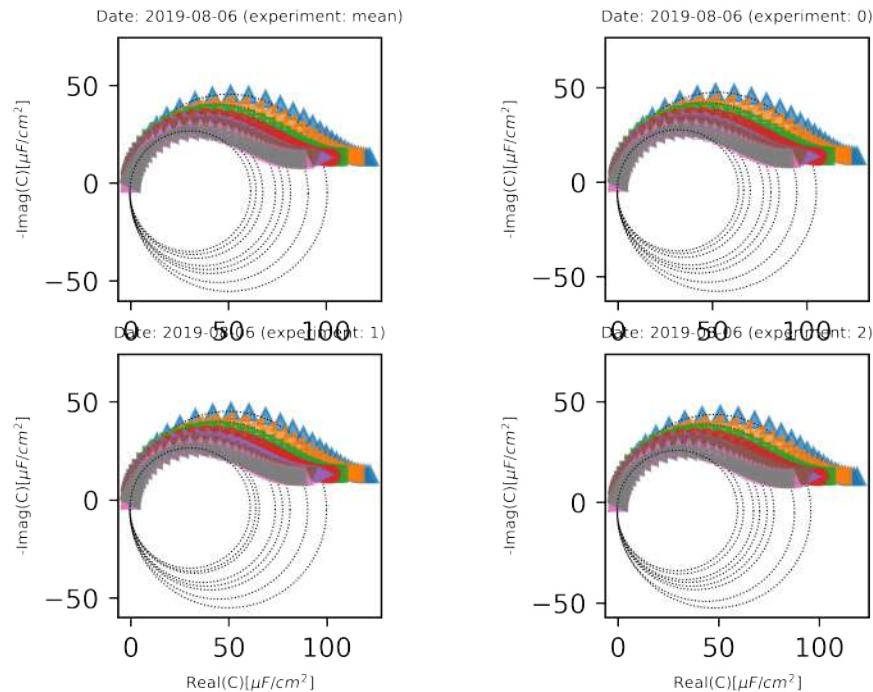






```
[15]: import matplotlib.pyplot as plt
      fontsize = 10
      date = dates[0]
      plt.figure(dpi=600)
      plt.subplot(2,2,1)
      DCTX.plot_impedance_semicircle(date, exp='mean', fontsize = 6,
      ↪show_legend=False)
      for exp in range(3):
          plt.subplot(2,2,exp+2)
          DCTX.plot_impedance_semicircle(date, exp=exp, fontsize = 6,
          ↪show_legend=False)
```

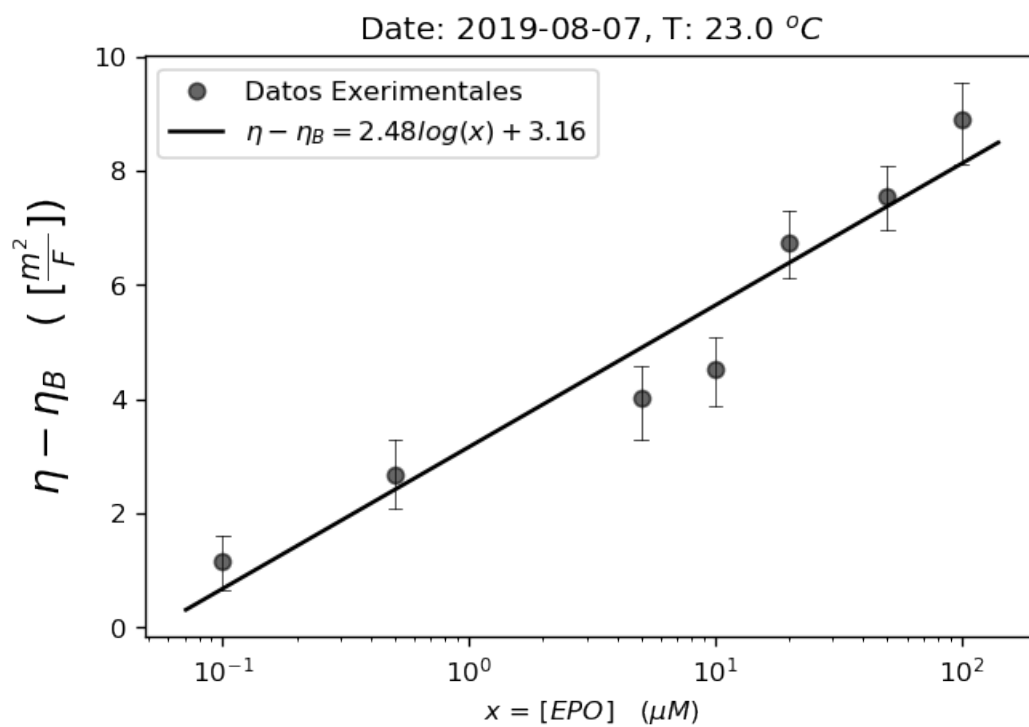
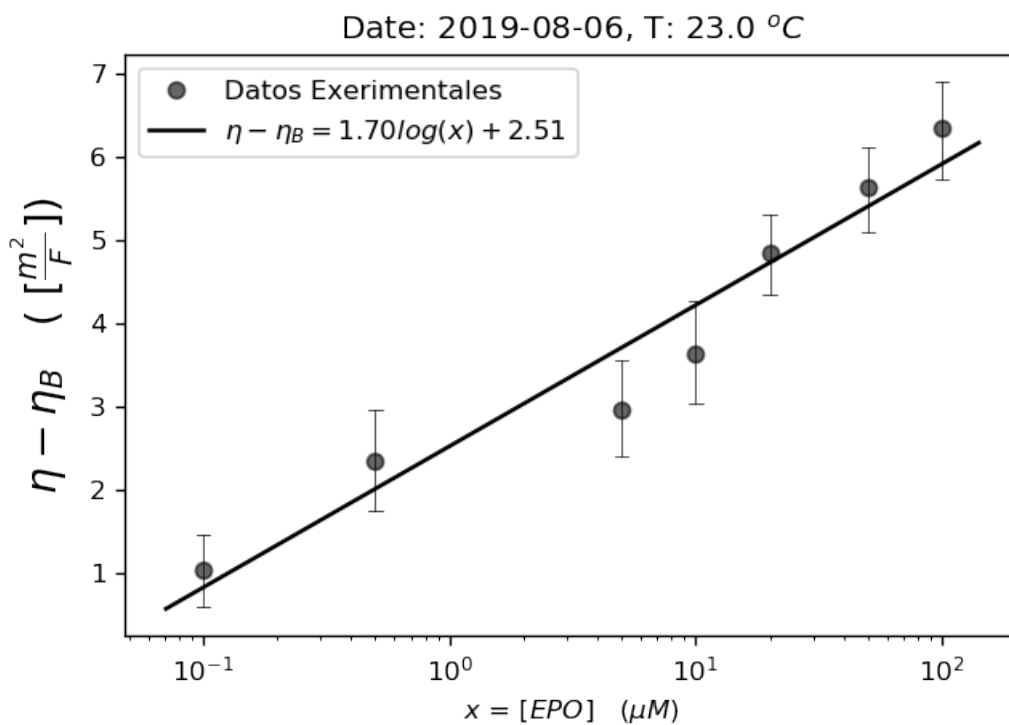
Ploting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: mean
 Ploting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 0
 Ploting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 1
 Ploting semicircles to date: 2019-08-06 . Experiment: 2

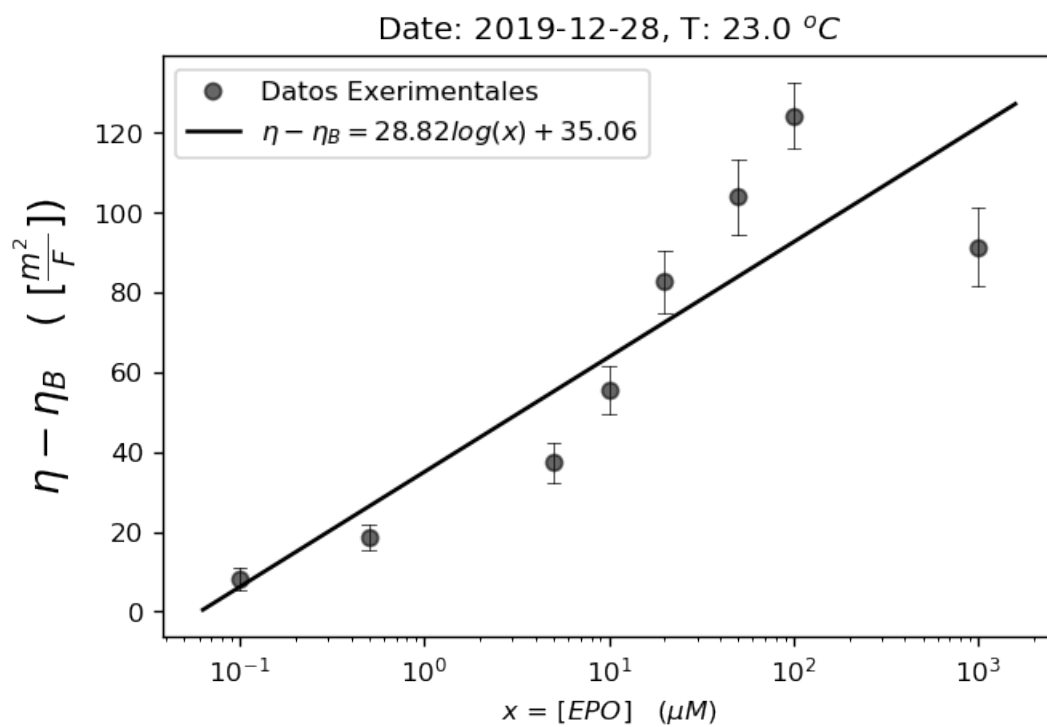
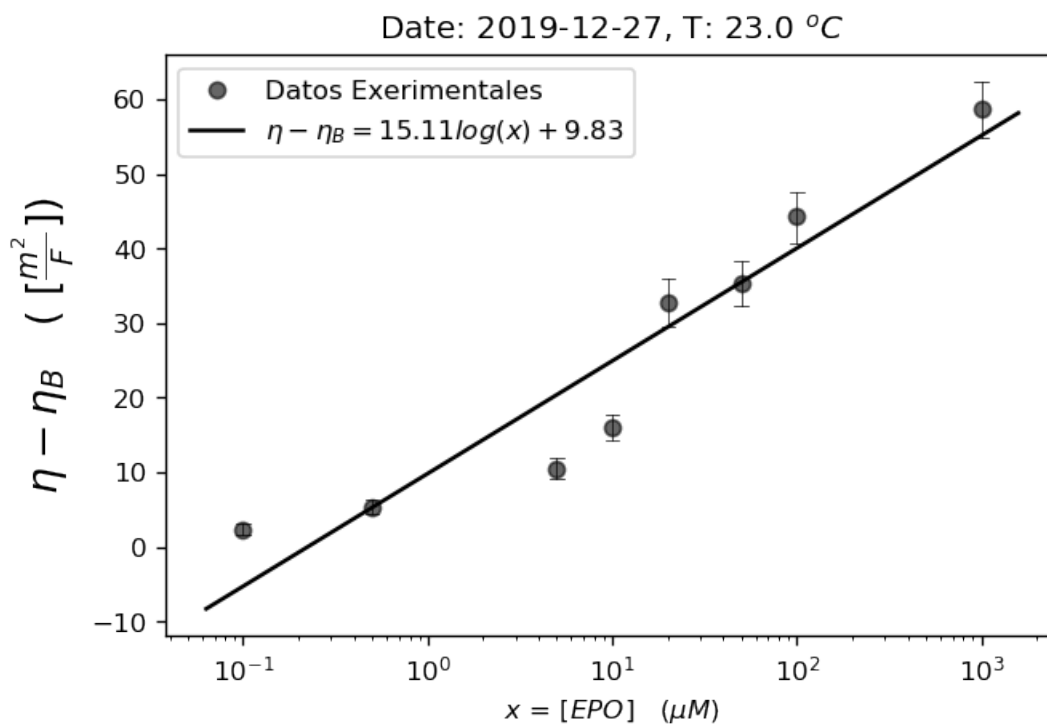


```
[16]: concentrations = DCTX.get_impedance_concentrations_by_date(dates[3])
      print(concentrations)
```

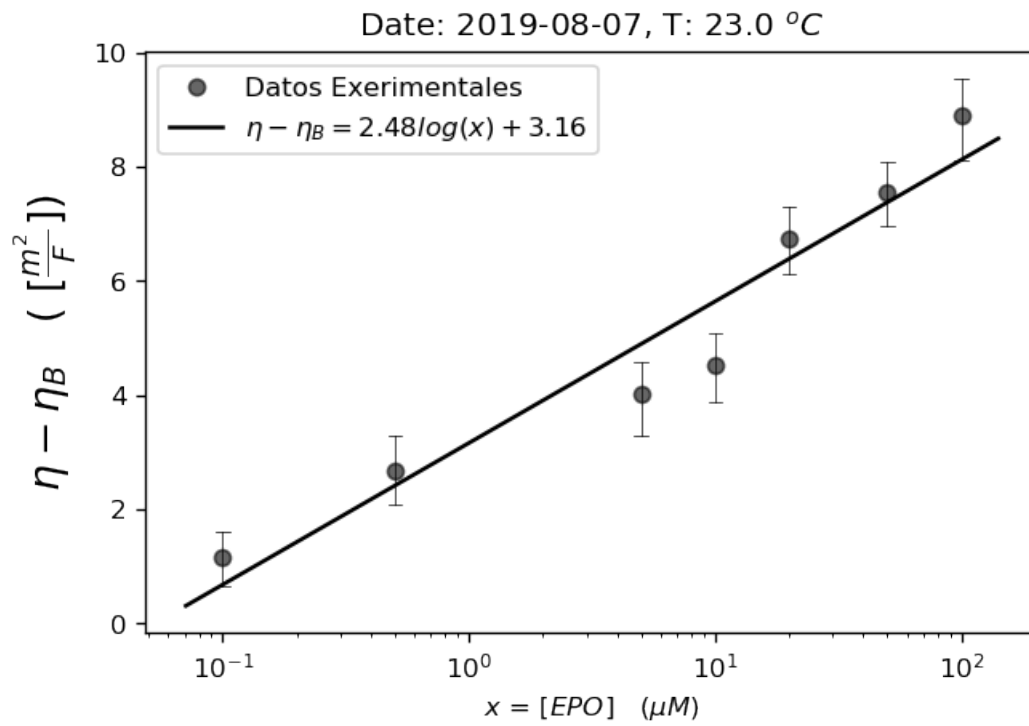
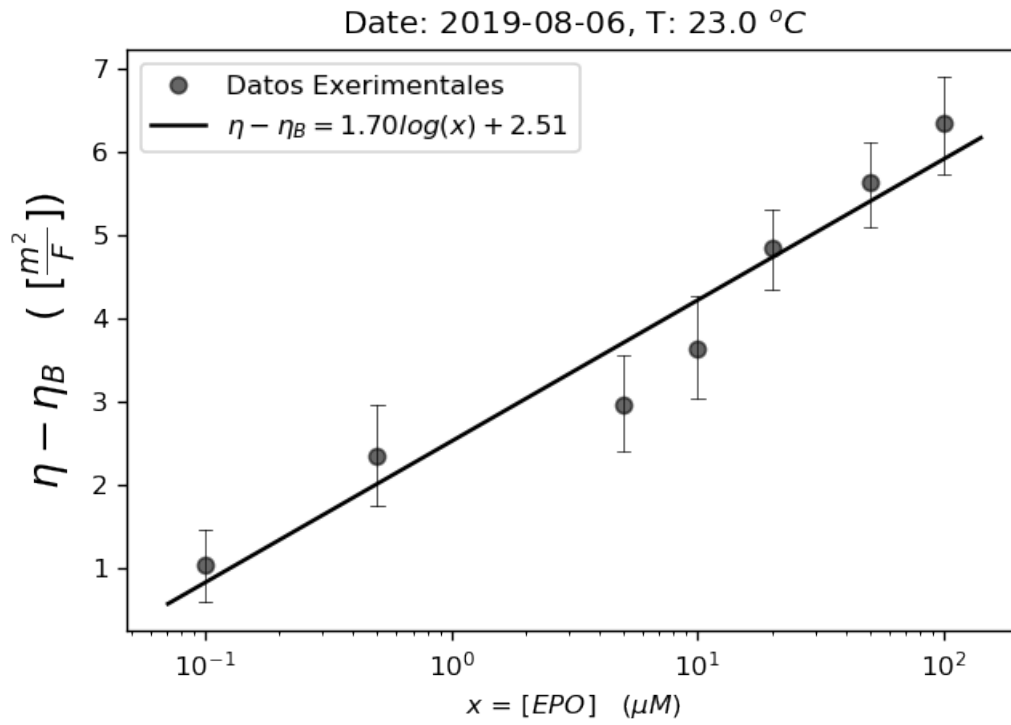
```
['0.0\\mu M' '0.1\\mu M' '0.5\\mu M' '10.0\\mu M' '100.0\\mu M'
 '1000.0\\mu M' '20.0\\mu M' '5.0\\mu M' '50.0\\mu M']
```

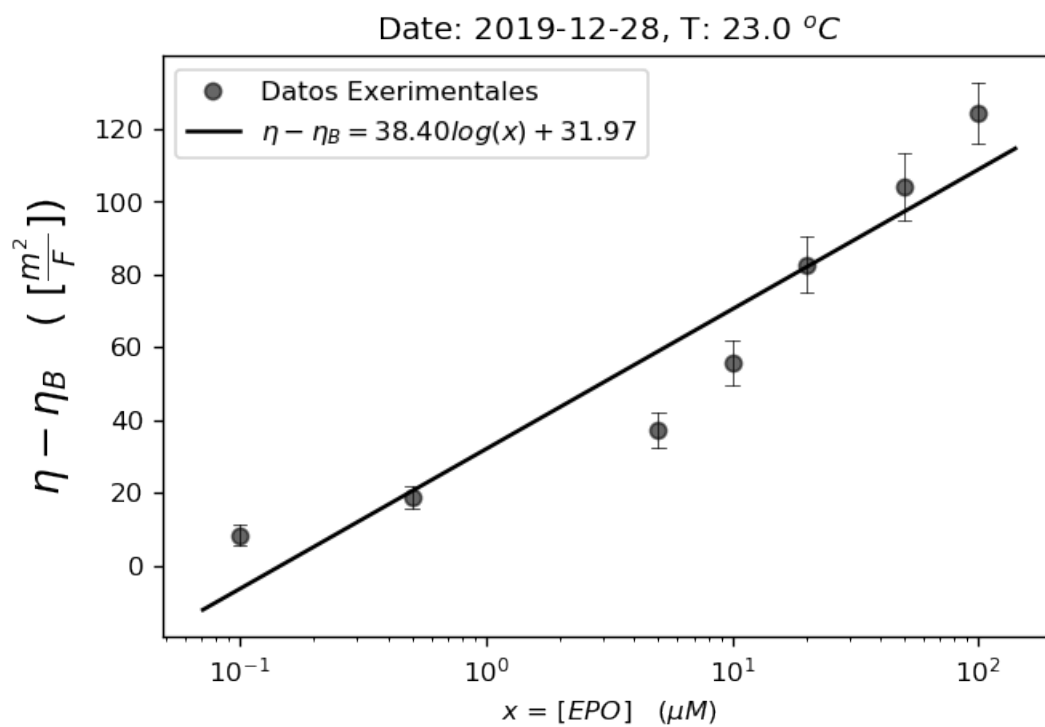
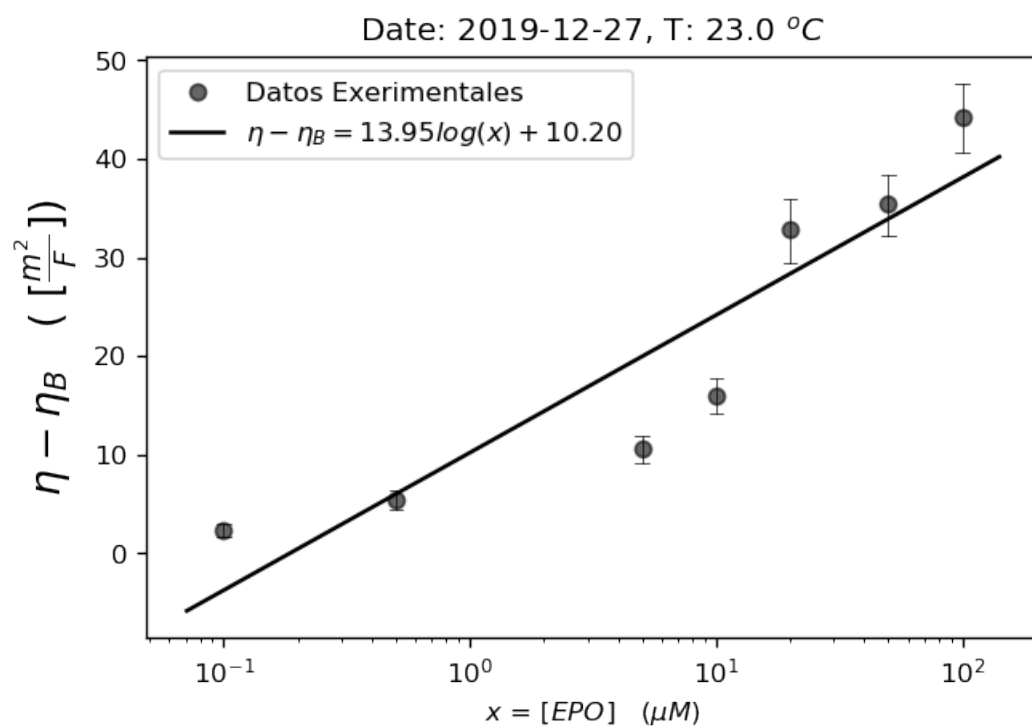
```
[19]: DCTX.get_all_hardness_calibration_curves(maximun_molar_fraction_uM=10000)
```





[20]: `DCTX.get_all_hardness_calibration_curves(exclude_molar_fractions_uM = [1000])`



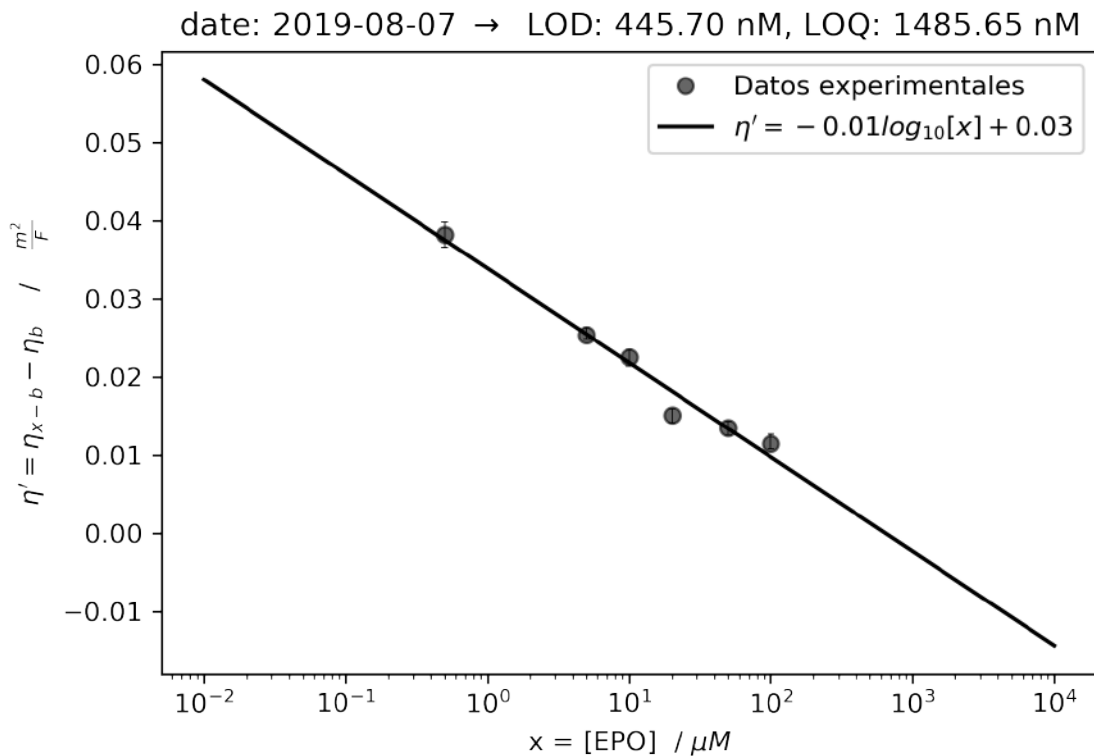


```
[22]: dates = DCTX.get_impedance_dates()
date = dates[1]

df = DCTX.get_effective_hardness_data(date)

p, LOD, LOQ = DCTX.get_effective_hardness_calibration_parameters(df, plot=True,
    dpi=300, exclude_molar_fractions_uM = [0.1], save_figure=True,
    figure_name='Effective_hardness_calibration_%s_DCTX.png' % (str(date)[:10]))
LOD_nM = 1e3 * LOD
LOQ_nM = 1e3 * LOQ
plt.title('date: '+str(date)[:10]+'r' '$\rightarrow$ LOD: %0.2f nM, LOQ: %0.2f'
    nM' % (LOD_nM, LOQ_nM))
print('LOD: %0.2f nM' % LOD_nM)
print('LOQ: %0.2f nM' % LOQ_nM)
```

Calibration data for the date: 2019-08-07
 LOD: 445.70 nM
 LOQ: 1485.65 nM



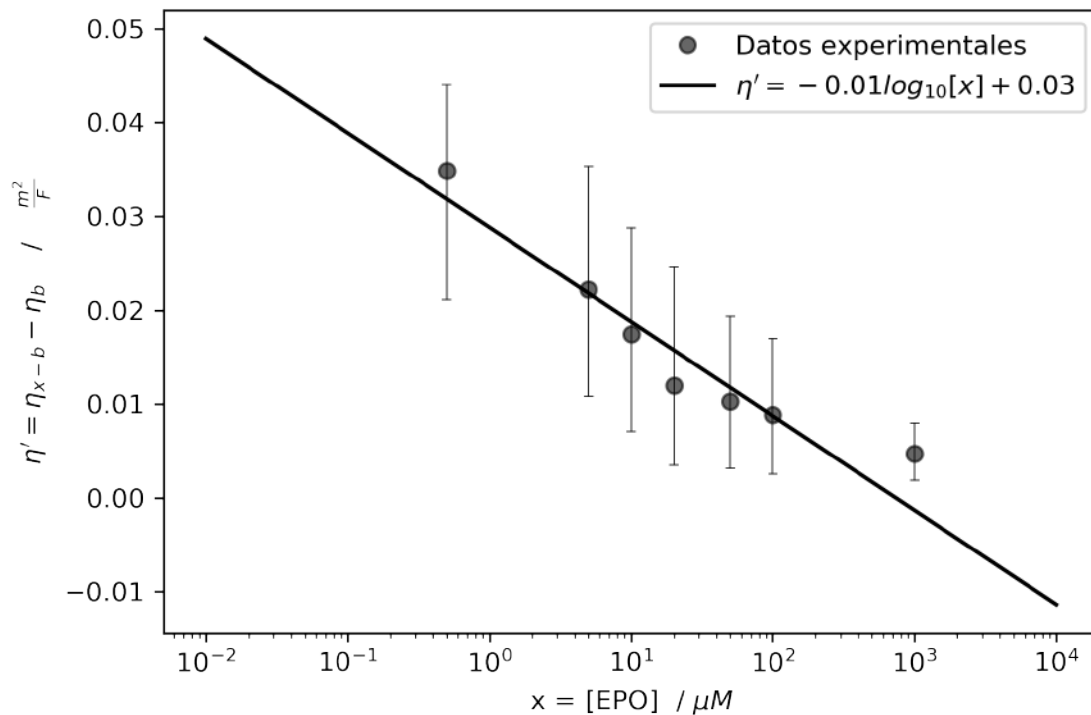
```
[23]: dates = DCTX.get_impedance_dates()
df = pd.DataFrame([])
for date in dates: # Para incluir los datos de todas las fechas
    df = DCTX.get_effective_hardness_data(date, df = df)

p, LOD, LOQ = DCTX.get_effective_hardness_calibration_parameters(df, plot=True,
    dpi=300, save_figure=True, exclude_molar_fractions_uM = [0.1],
    figure_name='Effective_hardness_calibration_with_all_data_DCTX.png')

LOD_nM = 1e3 * LOD
LOQ_nM = 1e3 * LOQ

print('LOD: %0.2f nM' % LOD_nM)
print('LOQ: %0.2f nM' % LOQ_nM)
```

Calibration data for the date: 2019-08-06
 Calibration data for the date: 2019-08-07
 Calibration data for the date: 2019-12-27
 Calibration data for the date: 2019-12-28
 LOD: 2224.55 nM
 LOQ: 7415.17 nM



```
[21]: hardness_subtracting_blank = lambda c: 1/(c[0] - c) - 1/c[0]
hardness = lambda c: 1/c - 1/c[0]

hardness_with_subtraction_df = pd.DataFrame([])
hardness_df = pd.DataFrame([])
for date in DCTX.get_impedance_dates():
    print('\nDate:', date)
    df_aux = DCTX.impedance_raw_dataframe(date)
    c = np.sort(list(df_aux.columns))
    df_aux = df_aux[c]

    df_hard = df_aux.apply(hardness, axis=1)
    df_subs = df_aux.apply(hardness_subtracting_blank, axis=1)
    print(df_subs[c[1:]])
    hardness_df = hardness_df.append(df_hard[c[1:]], ignore_index=True,
    ↪sort=False)
    hardness_with_subtraction_df = hardness_with_subtraction_df.
    ↪append(df_subs[c[1:]], ignore_index=True, sort=False)
```

Date: 2019-08-06

	0.1	0.5	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0
0	0.087360	0.041230	0.031944	0.026049	0.018973	0.016413	0.014740
1	0.093481	0.043539	0.034501	0.028119	0.019108	0.017655	0.015686
2	0.111411	0.044022	0.035373	0.028795	0.024627	0.019349	0.016987

Date: 2019-08-07

	0.1	0.5	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0
0	0.055379	0.036595	0.024852	0.021406	0.014148	0.012546	0.010838
1	0.068488	0.039826	0.025012	0.022701	0.015249	0.013640	0.010920
2	0.424607	0.038114	0.026327	0.023518	0.015951	0.014323	0.012703

Date: 2019-12-27

	0.1	0.5	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0	\
0	0.047658	0.021131	0.010794	0.007093	0.003493	0.003204	0.002549	
1	0.050792	0.022056	0.011247	0.007396	0.003612	0.003341	0.002682	
2	0.052869	0.022628	0.011580	0.007614	0.003690	0.003459	0.002777	

	1000.0
0	0.001893
1	0.002024
2	0.002113

Date: 2019-12-28

	0.1	0.5	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0	\
0	0.075585	0.032437	0.016599	0.011134	0.007455	0.005931	0.004855	
1	0.087441	0.036920	0.018569	0.012414	0.008357	0.006622	0.005609	

```
2  0.088502  0.039829  0.019746  0.013295  0.008983  0.007134  0.006069

      1000.0
0  0.006839
1  0.007544
2  0.008002
```

[]: