

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Analítica**



**PREPARACIÓN DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E  
INMUNOSENSORES BASADOS EN ELECTRODOS  
MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Verónica Carralero Sanz**

Bajo la dirección de los doctores  
José Manuel Pingarrón Carrazón, Paloma Yáñez-Sedeño Orive y  
Araceli González Cortés

**Madrid, 2009**

• ISBN: 978-84-692-2774-9

© Verónica Carralero Sanz, 2008

# PREPARACIÓN DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E INMUNOSENSORES BASADOS EN ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Verónica Carralero Sanz

Madrid, 2008

Universidad  
Complutense  
de Madrid

Departamento  
de Química  
Analítica



Facultad  
de Ciencias  
Químicas



*Todo comenzó hace seis años, allá por el 2002, cuando en quinto de carrera decidí coger la asignatura Proyecto, en aquellos momentos sentía la curiosidad de conocer lo que era trabajar en un laboratorio de Investigación. Lo recuerdo como si fuera ayer cuando Araceli me fue presentando a cada una de las personas que en este laboratorio trabajaban, explicándome en todo momento que hacía cada uno y que técnica empleaba. Todo me sonaba rarísimo, pero a su vez me suponía un gran reto, debía aprender cada una de esas técnicas que se empleaban, utilizar cada uno de esos aparatos que parecían tan distintos, y diseñar unos dispositivos que fueran capaces de medir concentraciones muy bajas con el fin de obtener buenos resultados, que en un futuro podrían publicarse. Era como un juego, en el que si llegabas al final tenías la posibilidad de volverte más o menos famoso dependiendo de un "tal" índice de impacto.*

*En estos momentos parece como si el juego que comencé hace seis años llegará a su final, sintiendo por un lado una gran alegría porque por fin veo reflejado todo el esfuerzo realizado durante este tiempo, y por otro miedo e incertidumbre por las decisiones que ahora he de tomar.*

*Durante este tiempo han sido muchos los momentos buenos que he vivido, pero también ha habido momentos de desesperación y de agobio, sintiéndome en ocasiones como en un tióvivo con los altibajos que ello conlleva. Aún así, me quedo con un buen recuerdo, porque tanto en los buenos como en los malos momentos siempre he podido contar con diferentes personas, capaces de alegrarse conmigo y dispuestos a ayudarme e intentar encontrar soluciones a problemas que parecían imposibles. Por este motivo, me gustaría agradecer a todos los que de una manera u otra han estado a mi lado durante este tiempo y sin los cuales no hubiera sido posible encontrarme en estos momentos escribiendo estas palabras.*

*Por ello, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis la Dra. Araceli González, la Dra Paloma Yáñez y. el Dr. J.M. Pingarrón, toda su ayuda y su dedicación durante este tiempo, sin la cual no hubiera sido posible sacar esta Tesis adelante.*

*También me gustaría mencionar a todas aquellas personas que durante este tiempo han pasado o aún se encuentran en el laboratorio, especialmente a Ana, Bea, Loli, Susana, María, Javi, Vane, Oscar y Marcos, por toda vuestra ayuda y comprensión porque sin duda sois los que mejor entendéis los altibajos que una Tesis conlleva, y sobretodo por haberme demostrado que no sólo sois compañeros de trabajo, sino amigos con los que siempre podré contar. ¡¡Muchas gracias a todos!!*

*A Lourdes, por aportar sus toques de creatividad a esta Tesis, por sus ánimos en los momentos de desesperación y por estar siempre dispuesta a ayudarme.*

*A Jesús, por el toque de humor que da cuando llega al laboratorio, por sacarme siempre una sonrisa y por hacerme ver lo positivo de las cosas.*

*A Gema y a Vanesa, las orgánicas, compañeras y amigas desde que empezamos la carrera. Las tres hemos seguido caminos idénticos, por lo que casi nos hemos vuelto inseparables. Juntas hemos compartido momentos inolvidables y seguiremos compartiendo ya que desde hace apenas unos meses sois testigos de todos mis pasos, ggg.*

*A mis amigos del pueblo, especialmente a David (el chirri), Asun, Alberto (tamayito), Esther (ricillos) y a Juanje (mi cuñaooo) por todos los buenos momentos que hemos compartido, por haber crecido juntos y poder contar siempre con vosotros.*

*A mis padres y hermana, por todo su apoyo y cariño a lo largo de mi vida, por estar siempre a mi lado, ayudarme, comprenderme y aguantarme en los momentos de agobio en los que me vuelvo insoportable. ¡Os quiero!*

*Muy especialmente a Javi, por su ayuda y paciencia, por estar siempre a mi lado, por hacerme sonreír incluso en los malos momentos y por la vida que juntos vamos a compartir (Twp).*

*Y por último, agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de la beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador y a la financiación del Proyecto BQU:2003-00365.*

**A mis padres y hermana**

---

# *ÍNDICE*

---

## I. INTRODUCCIÓN

I.1. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO .....	3
I.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO .....	7
I.3. ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO .....	13
I.4. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN EL EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (nAu).....	19
I.4.1. Biosensores enzimáticos .....	19
I.4.2. Inmunosensores electroquímicos .....	35
I.5. ANALITOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	48
I.5.1. Compuestos fenólicos .....	48
I.5.2. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos.....	50
I.5.3. Progesterona.....	61
I.5.4. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de progesterona empleando inmunosensores electroquímicos .....	62
I.5.5. Inmunoglobulinas .....	64

I.5.6. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de inmunoglobulinas empleando inmunosensores electroquímicos .....	66
--	----

## II. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

<b>II.1. BIOSENSOR DE TIROSINASA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO .....</b>	<b>75</b>
<b>II.1.1. Preparación del electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro y Tirosinasa .....</b>	<b>75</b>
<b>II.1.2. Caracterización del recubrimiento electrodico .....</b>	<b>78</b>
II.1.2.1. Determinación del recubrimiento.....	79
II.1.2.2. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) .....	79
II.1.2.3. Microscopia electrónica de barrido .....	83
<b>II.1.3 Medida del índice bioelectroquímico de polifenoles en vino empleando un biosensor de Tir-nAu-GCE .....</b>	<b>85</b>
<b>II.1.4. Medida del índice de polifenoles en vino mediante el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>85</b>

<b>II.2. PREPARACIÓN DE UN BIOSENSOR COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADO CON ORO COLOIDAL Y TIROSINASA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN MUESTRAS AMBIENTALES.....</b>	<b>87</b>
II.2.1. Preparación del biosensor compuesto Tir-Au <sub>col</sub> -grafito-Teflón.....	87
II.2.2. Cálculo de la actividad enzimática .....	89
II.2.3. Cálculo del área electroquímica de los electrodos grafito-Teflón y grafito-Teflón-oro coloidal mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría .....	90
II.2.4. Cálculo del coeficiente de difusión del fenol.....	92
II.2.5. Cálculo del coeficiente de transferencia electrónica para el fenol .....	92
II.2.6. Estimación del contenido total de compuestos fenólicos en aguas.....	92
II.2.7. Estimación del contenido total de compuestos fenólicos en muestras de alpechín .....	96

<b>II.3. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES COMPÓSITOS GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADOS CON ORO COLOIDAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN MUESTRAS DE LECHE.....</b>	<b>96</b>
II.3.1. Preparación del inmunosensor basado en un electrodo Au-col-grafito-Teflón .....	97
II.3.2. Realización del inmunoensayo competitivo simultáneo .....	98
II.3.3. Cálculo del coeficiente de difusión del naftol .....	99
II.3.4. Cálculo del coeficiente de transferencia electrónico del naftol .....	99
II.3.5. Preparación del inmunosensor basado en el empleo de un biosensor de Tir-Au-col-grafito-Teflón como transductor.....	101
II.3.6. Determinación de progesterona en leche.....	102
<b>II.4. INMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA INMUNOGLOBULINA G UTILIZANDO COMO TRANSDUCTOR UN BIOSENSOR DE TIROSINASA-ORO COLOIDAL-GRAFITO- TEFLÓN.....</b>	<b>104</b>
II.4.1. Preparación del inmunosensor.....	104

II.4.2. Realización del inmunoensayo tipo sándwich ..... 105

II.4.3. Determinación de inmunoglobulina G en sueros ..... 105

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN INTEGRADA

**III.1. BIOSENSORES DE TIROSINASA BASADOS  
EN EL EMPLEO DE DIFERENTES  
SUPERFICIES ELECTRÓDICAS  
MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE  
ORO ..... 109**

**III.1.1. Biosensor de tirosinasa basado en el empleo de un  
electrodo de carbono vitrificado modificado con  
nanopartículas de oro electrodepositadas ..... 111**

III.1.1.1. Caracterización mediante técnicas electroquímicas ..... 111

III.1.1.2. Aspectos más relevantes del biosensor Tir-nAu-  
GCE ..... 117

**III.1.2. Biosensor de tirosinasa basado en un electrodo  
compósito de grafito-teflón modificado con  
nanopartículas de oro ..... 123**

III.1.2.1. Caracterización de la superficie electródica  
mediante técnicas electroquímicas ..... 123

III.1.2.2.Aspectos más relevantes del biosensor Tir-Au <sub>col</sub> -GT .....	132
<b>III.1.3.Comparación de los biosensores Tir-nAu-GCE y Tir-Au<sub>col</sub>-GT .....</b>	<b>143</b>
<b>III.2 DESARROLLO DE INMUNOSENSORES BASADOS EN SUPERFICIES COMPÓSITAS NANOESTRUCTURADAS .....</b>	<b>146</b>
<b>III.2.1. INMUNOSENSORES COMPÓSITOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA .....</b>	<b>147</b>
<b>III.2.1.1.Inmunosensor basado en el empleo de un electrodo compuesto de grafito-Teflón modificada con nanopartículas de oro.....</b>	<b>147</b>
III.2.1.1.1.Estudios de la oxidación electroquímica del naftol sobre los electrodos grafito-Teflón y grafito- Teflón modificado con nanopartículas de oro.....	147
III.2.1.1.2.Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un electrodo de Au <sub>col</sub> -grafito-Teflón.....	151
<b>III.2.1.2.Inmunosensor basado en una superficie de grafito-Teflón modificada con nanopartículas de oro y Tirosinasa.....</b>	<b>154</b>

---

III.2.1.2.1. Caracterización de las superficies electródicas mediante espectroscopia de impedancia electroquímica .....	154
III.2.1.2.2. Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un electrodo Tir-Au <sub>col</sub> -grafito-Teflón .....	156
<b>III.2.1.3. Comparación de los inmunosensores basados en una superficie electródica Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón y Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón .....</b>	<b>159</b>
<b>III.2.2. INMUNOSENSOR COMPÓSITO PARA LA DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G EN SUERO .....</b>	<b>161</b>
III.2.2.1. Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un biosensor Tir-Au <sub>col</sub> -grafito-Teflón como transductor .....	161
<b>III.3. PUBLICACIONES .....</b>	<b>165</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>233</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>239</b>
<b>VI. GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>259</b>

---

# *INTRODUCCIÓN*

---

## **I.1. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO**

El OBJETIVO principal de este trabajo ha sido aprovechar las ventajas del empleo de superficies electródicas nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos con características analíticas mejoradas con respecto a otros diseños y la aplicación de los mismos a muestras reales de interés.

Dicho objetivo se encuadra dentro de los previstos en los siguientes Proyectos de Investigación subvencionados: “Desarrollo de nuevos biosensores para la detección rápida de microorganismos patógenos en alimentos”, BQU2003-00365; “Desarrollo de biosensores basados en electrodos de superficie nanoestructurada para la determinación de parámetros de calidad en alimentos”, PR27/05-13860 y “Diseño de superficies nanoestructuradas para la detección de moléculas bioactivas en alimentos”, CTQ2006-02905/BQU.

El PLAN DE TRABAJO desarrollado para alcanzar el objetivo marcado, consta de las siguientes etapas:

### 1.- Estudio del comportamiento electroquímico de los biosensores enzimáticos e inmunosensores empleando superficies nanoestructuradas con nanopartículas de oro.

Con objeto de evaluar el efecto de las nanopartículas de oro sobre el comportamiento electroquímico de los biosensores, se utilizarán diferentes técnicas electroquímicas como voltamperometría cíclica o amperometría en disolución agitada, comparándose los resultados con los obtenidos empleando biosensores preparados en idénticas condiciones pero en ausencia de nanopartículas. Las mejoras obtenidas en sensibilidad, reproducibilidad de las medidas, así como en la estabilidad de los dispositivos preparados, permitirán

demostrar las excelentes propiedades conductoras y catalíticas de este nanomaterial, así como su adecuación para inmovilizar moléculas biológicas sin producirse pérdidas apreciables de su bioactividad.

2.- Desarrollo de biosensores enzimáticos y amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos.

Con el fin de preparar biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos, se emplearán diferentes superficies electródicas y distintas estrategias de modificación de las mismas, empleando siempre nanopartículas de oro. Así, se preparará un biosensor basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas electrodepositadas, y se construirán biosensores enzimáticos compósitos, donde las nanopartículas se incluirán dentro de la propia matriz electródica tridimensional.

En ambos casos se optimizarán las variables experimentales que afecten tanto a la modificación de la superficie electródica, como a las respuestas amperométricas. Asimismo, se calcularán los parámetros cinéticos de la reacción enzimática sobre las superficies de los biosensores para varios compuestos fenólicos, y se evaluarán las características analíticas de los métodos desarrollados con ellos, lo que implica establecer los intervalos de linealidad de los calibrados, la evaluación de la precisión y el cálculo de los límites de detección y cuantificación para los compuestos estudiados.

Además, se caracterizarán las superficies mediante métodos electroquímicos y no electroquímicos.

3.- Desarrollo de inmunosensores amperométricos basados en una matriz compósita nanoestructurada.

Los electrodos compósitos son adecuados para la preparación de una gran variedad de configuraciones electródicas, presentando ventajas tales como la obtención de una mayor relación señal/ruido, la posibilidad de incorporar especies para mejorar la selectividad o sensibilidad del material electródico, así como la regeneración de su superficie por simple pulido. Por otro lado, la presencia de las nanopartículas de oro en la superficie del electrodo permite inmovilizar material biológico sin pérdida de su bioactividad, mejorando las características analíticas así como el tiempo de vida útil de los inmunosensores.

En esta parte del trabajo se prepararán varios inmunosensores basados en el empleo de electrodos compósitos conteniendo nanopartículas de oro, con el fin de aprovechar las ventajas de este nanomaterial, estudiándose para cada uno de ellos la influencia que ejercen las distintas variables experimentales sobre la respuesta amperométrica. En cada caso, se llevará a cabo un seguimiento, mediante espectroscopia de impedancia faradaica, de cada una de las etapas implicadas en la preparación del inmunosensor, así como de las relacionadas con la realización del inmunoensayo correspondiente. Finalmente se estudiará la estabilidad y las características analíticas de los diferentes inmunosensores.

4.- Aplicación de los biosensores enzimáticos e inmunosensores desarrollados al análisis de muestras reales.

Tanto los biosensores como los inmunosensores desarrollados se aplicarán a la determinación de analitos de interés en muestras reales.

Por lo que se refiere a los biosensores enzimáticos, se llevará a cabo la estimación del contenido de compuestos fenólicos en diferentes tipos de muestras, con el fin de proporcionar un “índice” del contenido total de fenoles, que permita estimar de una forma rápida y fiable si dicho contenido es superior al valor establecido en la legislación y, si es así, poder tomar decisiones oportunas en el menor tiempo posible.

El biosensor basado en la modificación de un electrodo de carbono vitrificado, se aplicará a la determinación de polifenoles en vinos, mientras que el biosensor compuesto se aplicará a muestras de aguas procedentes de una refinería de petróleo y a muestras de alpechín. La validez de la metodología empleada se verificará mediante comparación de los resultados obtenidos con los proporcionados por un método de referencia.

En cuanto a los inmunosensores, éstos se emplearán para la determinación de analitos de interés en la industria ganadera y en análisis clínico. Así, se llevará a cabo la determinación de progesterona en leche y de inmunoglobulina G en suero. En ambos casos las muestras ensayadas serán previamente enriquecidas con los compuestos estudiados, con el fin de evaluar la exactitud de los métodos, así como la existencia de efecto matriz.

## **1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO**

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente las de oro, han despertado un gran interés debido a las interesantes propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas, y catalíticas de estos materiales. Estas propiedades dependen en gran medida de su tamaño y de su forma, los cuales vienen determinados por las condiciones experimentales empleadas en su obtención. Así, se producen cambios considerables en las propiedades ópticas del material al disminuir el tamaño de partícula a escala nanométrica. Por ejemplo, las disoluciones coloidales de nanopartículas de oro presentan un color rojo característico, color rubí, derivado de las dimensiones de las partículas del metal.

Cuando un haz de radiación incide sobre nanopartículas de metales como el oro se produce una oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal, lo que se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro visible, dando lugar a espectros con bandas de resonancia conocidas como plasmones. Este fenómeno, conocido como absorción de plasmón superficial, es una propiedad característica de superficies de un tamaño determinado; así, no se observa en partículas de tamaño inferior a 1-2 nm (dimensiones quantum), ya que sus electrones están en niveles de energía discretos; por otra parte, el oro metálico presenta una absorción continua en la región UV/Vis/IR. En el caso de las nanopartículas de oro, esta absorción continua decae drásticamente, excepto en una zona concreta denominada banda de absorción del plasmón.

El comportamiento plasmónico de las nanopartículas de oro viene también determinado por su funcionalización, pudiendo emplearse la medida de la absorbancia del plasmón para caracterizar las nanopartículas.

Uno de los problemas asociados a las nanopartículas de oro es la elevada tendencia que presentan a flocular en presencia de electrolitos. Por tanto, es necesario tomar las precauciones necesarias en su preparación, con el fin de evitar la formación de agregados o su precipitación.

La preparación de nanopartículas de oro generalmente implica la reducción química de una sal de oro en medio acuoso u orgánico, en presencia de un agente estabilizante o protector adecuado, el cual se une a la superficie de las nanopartículas aumentando su estabilidad y neutralizando las fuerzas electrostáticas. Las dispersiones de las nanopartículas preparadas en presencia de un estabilizador son estables a temperatura ambiente durante largo tiempo, no observándose precipitación del coloide al cabo de varios meses.

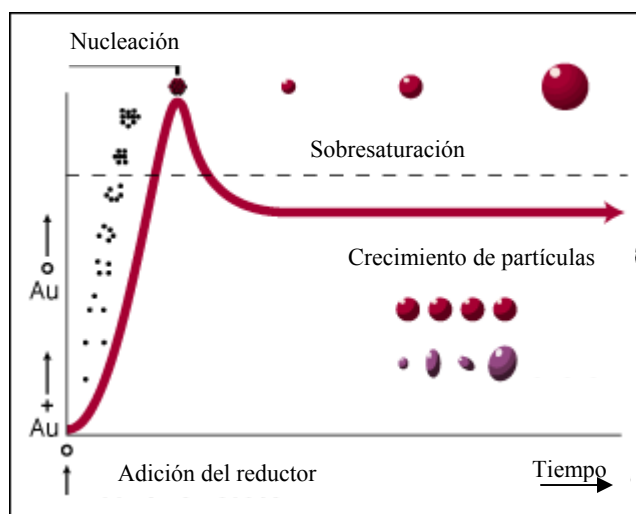
Se han empleado una gran variedad de agentes estabilizantes. Sin embargo, el procedimiento de obtención de nanopartículas más utilizado, probablemente debido a su sencillez y los buenos resultados que proporciona, es el basado en el uso de citrato como reductor, que a su vez actúa de estabilizante, impidiendo la formación de agregados [Cai, 2001]. Además, es de gran importancia destacar que las partículas sintetizadas por reducción con citrato pueden considerarse esferas monodispersas, cuyo tamaño puede ser controlado fijando la concentración de citrato empleada. Así, en la *Tabla 1* se recoge el tamaño de nanopartícula obtenido para diferentes volúmenes de disolución de citrato al 1% adicionado en la síntesis.

**Tabla 1.-** Variación del diámetro de las nanopartículas en función del volumen de citrato sódico adicionado.

Volumen de disolución de citrato sódico al 1%, mL	Diámetro, nm (medidos por SEM)
1.0	16
0.75	25
0.5	41
0.3	72
0.21	98
0.16	147

SEM: microscopia electrónica de barrido

En la *Figura 1* se esquematiza el proceso de reducción del oro iónico que tiene lugar cuando se añade el reductor.



**Figura 1-** Reducción de oro iónico para formar partículas de oro

Antes de añadir el reductor, sólo hay iones oro en la disolución. Inmediatamente después de adicionar el reductor, se produce un crecimiento brusco en el número de átomos de oro en disolución, hasta alcanzar una situación de sobresaturación. Después de este proceso tiene lugar el crecimiento

de las partículas formadas en el proceso de nucleación, dando lugar a la aparición de agregados.

La cantidad de reductor adicionada determina el número y el tamaño de las partículas de oro obtenidas. Así, una cantidad elevada de reductor da lugar a la formación de un gran número de átomos de oro (núcleos) iniciales y, por tanto, a la obtención de un mayor número de partículas de oro de menor tamaño.

Las condiciones de preparación óptimas implican la formación rápida y simultánea de las partículas iniciales, de modo que su crecimiento es exactamente el mismo, obteniéndose así nanopartículas de oro del mismo tamaño (monodispersas).

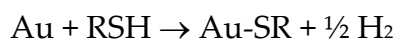
El color de la suspensión obtenida, rojo rubí, es señal de la calidad de las partículas obtenidas en cuanto a forma esférica y tamaño nanométrico reproducible, de la suspensión de oro coloidal obtenida. Una suspensión de color púrpura es señal de que se ha producido la agregación de partículas, obteniéndose partículas de forma y tamaño irreproducible. Como veremos, la uniformidad en el tamaño es esencial en la fabricación de dispositivos basados en el empleo de nanopartículas de oro que proporcionen medidas estables y reproducibles.

Las nanopartículas así preparadas poseen carga superficial negativa como consecuencia de la débil unión al citrato, empleado como reductor. Debido a la carga, las partículas se repelen entre sí, manteniéndose en suspensión indefinidamente.

Como ya se ha comentado, la longitud de onda del máximo de absorción del plasmón depende tanto del tamaño como de la forma de la nanopartícula.

Por otra parte, la posición de la banda del plasmón varía con la funcionalización de las nanopartículas. Este fenómeno puede aprovecharse para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas. Así, por ejemplo, las partículas de 15 nm de diámetro presentan un máximo a 520 nm.

Otros procedimientos para la obtención de nanopartículas de oro implican el empleo de derivados de tioles, que permiten la preparación de nanopartículas funcionalizadas con una gran variedad de ligandos orgánicos y biomoléculas sin pérdidas de su actividad. En presencia de estas moléculas protectoras, tiene lugar un recubrimiento de la superficie del agregado incipiente, evitando su excesivo crecimiento y la pérdida de sus propiedades coloidales. Esta adsorción ocurre por la formación de enlaces covalentes Au-S, según la reacción:



La fortaleza de estos enlaces viene determinada por la alta afinidad química del grupo tiol por los átomos de oro.

Otras posibilidades implican la encapsulación de las nanopartículas en fase acuosa, en el interior de micelas inversas presentes en microemulsiones o la dispersión de las mismas en matrices poliméricas.

A pesar de los grandes progresos en la síntesis de nanopartículas de oro, aún se están diseñando nuevos procedimientos que permitan un mayor control del tamaño, forma y reactividad química de las nanopartículas preparadas, habida cuenta de sus numerosas aplicaciones en campos tan importantes como la obtención de los nanosensores, biosensores, catálisis y nanoelectroquímica.

Por otra parte, cabe destacar el interés creciente que han recibido la preparación de bioconjugados, basados en la modificación de las nanopartículas

de oro por unión a moléculas biológicas, ya que en estos materiales híbridos pueden conjugarse las propiedades inherentes a las partículas metálicas coloidales con las de reconocimiento molecular propias de este tipo de moléculas. Así, se han desarrollado procedimientos de síntesis de nanopartículas de oro de tamaño y forma controlados que, además, pueden ser funcionalizadas fácilmente con biomoléculas como péptidos, enzimas, anticuerpos, ADN, etc.

### **I.3. ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

La preparación y el empleo de superficies electródicas nanoestructuradas constituye una línea de investigación de gran interés y actividad en electroanálisis. De los diferentes tipos de nanomateriales existentes, cabe destacar el empleo de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro para la preparación de sensores y biosensores electroquímicos. En la naturaleza podemos encontrar materiales nanoestructurados metálicos, óxidos y semiconductores. En cuanto a las nanopartículas metálicas, éstas poseen excelentes propiedades conductoras y catalíticas, permitiendo la construcción de “nanoarrays”, con una relación señal/ruido varios órdenes de magnitud superior a la de los electrodos convencionales, y con la ventaja de que pueden obtenerse series ordenadas de nanoelectrodos en una o varias dimensiones.

El empleo de nanopartículas de oro para la modificación de superficies electródicas es aplicable tanto a la construcción de sensores químicos como de biosensores. En el primer caso, las nanopartículas, funcionalizadas o no, actúan como fase sensora, catalizando los procesos redox de algunas moléculas de interés, como peróxido de hidrógeno, oxígeno o NADH, que participan en reacciones bioquímicas útiles desde el punto de vista analítico, y que además pueden monitorizarse empleando técnicas electroquímicas [Hernández-Santos, 2002 y Rashid, 2006]. En el caso de los *biosensores*, el acoplamiento de nanopartículas de oro con los elementos de reconocimiento biológico, permiten construir fases sensoras con propiedades mejoradas.

En la bibliografía se han encontrado diversas estrategias para la modificación de diferentes superficies electródicas con nanopartículas de oro, entre las que cabe destacar: a) la unión de las nanopartículas a los grupos

activos de monocapas autoensambladas (SAMs), b) la adsorción de las nanopartículas de oro sobre la superficie electródica por inmersión del electrodo en una disolución de oro coloidal durante un tiempo determinado, c) la inmovilización directa de las nanopartículas sobre la superficie electródica mediante electrodeposición del nanomaterial, para lo cual se sumerge el electrodo en una disolución de ácido tetracloroaúrico y se aplica un potencial durante un tiempo determinado. La variación del potencial aplicado y del tiempo de aplicación permiten controlar el tamaño de las partículas electrodepositadas y d) la incorporación a la matriz en el caso de emplear electrodos compósitos.

En los últimos años, los diseños electródicos basados en nanopartículas metálicas, especialmente de oro, están siendo ampliamente utilizados por sus atractivas características físico-químicas. Además, la facilidad de preparación y la posibilidad de funcionalización, las hace muy apropiadas para el desarrollo de electrodos modificados para la determinación tanto de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos o carbohidratos [Hernández-Santos, 2002], como de sustancias tóxicas [Renedo, 2007].

Como consecuencia de esto, son numerosos los sensores nanoestructurados encontrados en la bibliografía, donde se aprovecha el efecto electrocatalítico que ejercen las nanopartículas de oro, disminuyendo el potencial de detección de los analitos de interés, así como, las mejoras que se presentan en cuanto a las características analíticas del sensor [Cai, 2001].

Así, por ejemplo, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un sensor para la determinación de metionina, en el que las nanopartículas de oro son inmovilizadas sobre un electrodo de pasta de carbono previamente modificado con una monocapa de cisteamina. La modificación de la superficie electródica con este nanomaterial permite obtener un bajo límite de detección,

0.59  $\mu\text{M}$ , y llevar a cabo un método selectivo de detección de metionina en presencia de otros aminoácidos o vitaminas [Agüí, 2004].

Otros autores han preparado un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de metiltrimetoxisilano y nanopartículas de oro, para la obtención de un sensor de peróxido de hidrógeno. Es de destacar el bajo límite de detección, 3.15 nM, sin el empleo de mediador ni de enzimas inmovilizadas [Maduraiveeran, 2007].

Otro diseño reportado por Jena y colaboradores para la determinación de glucosa, se basa en el empleo de nanopartículas de oro autoensambladas a los grupos tioles de una matriz tridimensional sol-gel. Las propiedades catalíticas de las nanopartículas de oro han hecho posible la medida de la señal de oxidación de la glucosa a potenciales tan bajos como 0.16 V, obteniéndose al mismo tiempo una excelente sensibilidad y un límite de detección de 50 nM [Jena, 2006].

Recientemente el grupo de Li M. ha preparado un sensor para la determinación de dopamina empleando un electrodo de oro modificado con ditiocarbamato sobre el que se electrodepositan nanopartículas de oro. Es de destacar la gran estabilidad de la superficie sensora, así como la elevada eficiencia catalítica hacia la oxidación de la dopamina, lo que da lugar a un aumento de la sensibilidad, reproducibilidad y tiempo de vida útil con respecto a otras configuraciones encontradas en la bibliografía [Li M., 2008].

Uno de los principales problemas que presenta la determinación de dopamina es la interferencia de sustancias como el ácido ascórbico, presente comúnmente en concentraciones elevadas en la mayor parte de las muestras biológicas. El empleo de superficies electródicas modificadas con nanopartículas de oro ha permitido llevar a cabo la detección selectiva de dopamina en presencia de ácido ascórbico, basándose en el efecto

electrocatalítico que ejercen las nanopartículas de oro sobre el proceso de oxidación del ácido ascórbico. Las nanopartículas de oro han sido inmovilizadas sobre un electrodo de oro previamente modificado con una monocapa de cisteamina. Los resultados obtenidos mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría de onda cuadrada ponen de manifiesto la buena sensibilidad y selectividad obtenida para ambas especies con respecto al empleo de un electrodo de oro sin modificar, alcanzándose un límite de detección de  $0.13 \mu\text{M}$ . [Raj, 2003].

El empleo de un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película polimérica de poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y nanopartículas de oro constituye una nueva estrategia para la determinación de dopamina en presencia de ácido ascórbico. En este dispositivo, la dopamina, más hidrofóbica, interacciona preferentemente con la región no conductora del polímero (forma reducida), mientras que el ácido ascórbico, más hidrofílico, interacciona con la región conductora (forma oxidada), dando lugar a un notable desplazamiento de la señal de oxidación del ácido ascórbico hacia valores de potencial menos positivos, observándose así una separación de 230 mV entre los picos de oxidación de ambos compuestos. Por otra parte, la adsorción de la dopamina sobre las nanopartículas de oro, a través del débil enlace de los grupos amino, da lugar a un significativo aumento de la corriente de oxidación, obteniéndose un marcado aumento de la sensibilidad de la determinación [Kumar, 2005].

Otro ejemplo de sensor nanoestructurado para la determinación de este compuesto, desarrollado por Wang P. y colaboradores, consiste en la inmovilización covalente de las nanopartículas de oro sobre un electrodo de carbono vitrificado modificado con una monocapa de colina. El efecto electrocatalítico diferenciador que ejerce la monocapa de colina modificada con nanopartículas de oro sobre las señales de oxidación de dopamina, ácido

ascórbico y ácido úrico, permite, por una parte, un aumento de la sensibilidad de las señales de oxidación y, por otra, la resolución de mezclas de los tres componentes permitiendo su determinación conjunta en una misma muestra [Wang P., 2007].

Un ejemplo de sensor nanoestructurado para la determinación de biomoléculas de interés clínico es el desarrollado por Goyal y col. La preparación del sensor implica el empleo de una superficie electródica de óxido de titanio e indio (ITO) modificada con nanopartículas de oro quimisorbidas. El sensor ha sido aplicado a la determinación de un corticoide sintético con propiedades antiinflamatorias en muestras de orina y sangre. Las medidas se llevan a cabo por voltamperometría diferencial de impulsos, comparándose los resultados obtenidos con los conseguidos con un electrodo de oro y un electrodo de ITO sin modificar con las nanopartículas de oro. Los voltamperogramas registrados ponen de manifiesto la ventaja del empleo de superficies nanoestructuradas, ya que el efecto electrocatalítico ejercido por las nanopartículas de oro da lugar a una disminución del potencial del pico de oxidación del analito, así como a un aumento de la sensibilidad de la señal [Goyal, 2007].

Jin y colaboradores han desarrollado un sensor para la determinación de epinefrina en presencia de ácido ascórbico. Para ello, han empleado como superficie electródica un electrodo de carbono vitrificado sobre el que se han electrodepositado nanopartículas de oro. El efecto electrocatalítico ejercido por el nanomaterial sobre la corriente de oxidación del ácido ascórbico, ha permitido llevar a cabo la determinación de ambas especies de forma selectiva, observándose una separación de 183.5 mV entre ambos picos de oxidación [Jin, 2002].

Se han encontrado en la bibliografía diferentes sensores modificados con nanopartículas de oro para la determinación de sustancias tóxicas de interés. Así, los electrodos serigrafados (“screen-printed”), carbono vitrificado, platino, y de grafito han sido ampliamente empleados para la determinación de especies tales como arsénico [Song, 2006], antimonio [Renedo, 2007], óxido de nitrógeno e hidrazina.

Como ejemplo de sensor nanoestructurado para la determinación de óxido nítrico, el grupo de Zhu M. y col. ha desarrollado un microsensor, empleando microelectrodos de platino modificados con una monocapa de cisteína sobre la que se unen covalentemente las nanopartículas de oro. En este caso se observa el efecto electrocatalítico que ejerce el nanomaterial sobre la oxidación del óxido de nitrógeno, disminuyendo el potencial de detección en 250 mV respecto de la señal obtenida sobre el microelectrodo sin modificar. La interferencia de nitrito y nitrato en la determinación del óxido nítrico se evita recubriendo la superficie sensora con una película de Nafion [Zhu M., 2002].

En otro trabajo realizado por Jena y colaboradores se ha empleado una superficie tridimensional sol-gel modificada con nanopartículas de oro para la determinación de hidrazina. En este caso se obtiene una disminución del potencial de oxidación de la hidrazina de aproximadamente 800 mV, así como un aumento en la corriente de pico con respecto a la señal obtenida sobre un electrodo de oro convencional, lo que permite alcanzar un límite de detección de 200 pM [Jena, 2007].

## **I.4. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN EL EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (*nAu*)**

### **I.4.1. Biosensores enzimáticos**

Como ya se ha dicho, la importancia de los sistemas electroanalíticos basados en nanopartículas de oro se debe a las propiedades superficiales, electrónicas y catalíticas únicas de este material [Liu S., 2003a y Katz, 2004]. Además presentan la ventaja de que las enzimas adsorbidas retienen su actividad biológica, lo que no ocurre sobre otros materiales electrónicos, como superficies metálicas pulidas, debido probablemente a la mayor libertad de orientación que poseen las biomoléculas inmovilizadas sobre las nanopartículas [Liu S., 2003b].

Por otra parte, las nanopartículas actúan como medio de conducción electrónico entre el grupo prostético de las enzimas y la superficie del electrodo, facilitando la transferencia electrónica. Esta ventaja se ha aprovechado para la preparación de biosensores enzimáticos sin necesidad de mediador, también llamados de tercera generación, en los que las nanopartículas de oro posibilitan la transferencia de carga directa entre el grupo redox de la proteína y la superficie del electrodo, alcanzándose elevados niveles de estabilidad y sensibilidad [Yáñez-Sedeño, 2005 y Liu S., 2003a].

En la *Tabla 2* se recogen los biosensores enzimáticos encontrados en la bibliografía basados en el empleo de nanopartículas de oro, mostrándose el procedimiento de inmovilización empleado, así como las características de funcionamiento y las características analíticas obtenidas en cada caso.

Uno de los diseños más simples consiste en la deposición directa de las nanopartículas sobre la superficie electrónica. Esta configuración permite obtener biosensores estables, de respuesta rápida y elevada sensibilidad. Así,

por ejemplo, Zhang y col. prepararon un biosensor para la determinación de glucosa en el que la enzima glucosa oxidasa (GOx) se inmoviliza por unión covalente sobre un electrodo de oro previamente modificado con nanopartículas de oro [Zhang S., 2005]. En otro trabajo, Shulga y col. demuestran que la electrodeposición de nanopartículas de oro sobre un electrodo de oro proporciona una superficie electródica adecuada para la inmovilización de la enzima acetilcolinesterasa. El biosensor obtenido se utilizó para la determinación de carbofuran a muy bajos niveles de concentración [Shulga, 2007].

En un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación, se inmoviliza la enzima xantina oxidasa (XOD) por entrecruzamiento con glutaraldehído. La preparación del biosensor implica la electrodeposición previa de nanopartículas de oro sobre la superficie de un electrodo de pasta de carbono y posterior inmovilización de la enzima por entrecruzamiento con glutaraldehído y BSA. El biosensor se empleó para la determinación de hipoxantina (Hx) en sardinas y carne de pollo [Agüí, 2006]. La detección de Hx se lleva a cabo a +0.6 V aproximadamente, sobre electrodos convencionales. Sin embargo con la configuración del biosensor desarrollado con las nanopartículas de oro, es posible realizar dicha detección a un potencial de 0 V, minimizando interferencias como el ácido ascórbico. El límite de detección obtenido al aplicar este potencial es de 0.22  $\mu\text{M}$ , siendo del mismo orden que los encontrados en la bibliografía, con biosensores que operan a potenciales mucho más elevados.

El empleo de superficies electródicas modificadas con monocapas autoensambladas de tioles permite la incorporación de enzimas, mediadores, agentes de entrecruzamiento o nanopartículas metálicas. Esta posibilidad de modificación, junto con la variedad de cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud de que se dispone, permite una gran versatilidad en el diseño del

sensor para diferentes aplicaciones. Además, los dispositivos basados en el empleo de monocapas autoensambladas proporcionan, en general, una elevada relación señal / ruido y una buena reproducibilidad de las medidas realizadas, así como de los procedimientos de fabricación.

Como ejemplos, cabe destacar la preparación de biosensores de glucosa oxidasa empleando distintas configuraciones basadas en el empleo de monocapas autoensambladas sobre un electrodo de oro. De entre ellas, la obtenida incorporando oro coloidal y GOx sobre una monocapa de cisteamina es la que proporciona una mayor sensibilidad y un mayor tiempo de vida operacional [Mena, 2005a]. Otro ejemplo de un diseño de este tipo, es la preparación de un biosensor de peroxidasa basado también en el empleo de monocapas de cisteamina y nanopartículas de oro para el estudio de la transferencia electródica directa de la enzima inmovilizada, observándose la aparición de un par de picos en el voltamperograma cíclico correspondiente atribuidos a la reacción enzimática. El biosensor muestra una excelente respuesta electrocatalítica para la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin necesidad de mediador [Yi, 2000]. Recientemente, Lin y col. han preparado un biosensor amperométrico de peroxidasa basado en la modificación de un electrodo de óxido de indio-titanio (ITO) con una monocapa de (3-mercaptopropil) trimetoxisilano y nanopartículas de oro y posterior coinmovilización de la enzima peroxidasa y el mediador tetrametilbencidina [Lin, 2007b].

Es de destacar otra configuración basada en la unión de las nanopartículas de oro a nanoesferas porosas funcionalizadas con grupos tioles de poli(divinilbenceno-co-ácido acrílico) para la preparación de un biosensor de peroxidasa, consiguiéndose buenas características analíticas [Xu S., 2007].

La incorporación de nanomateriales a matrices compósitas constituye una estrategia muy útil para la preparación de biosensores con excelentes características analíticas. Los dispositivos obtenidos no solo presentan las

ventajas propias de los nanomateriales, sino también las derivadas de los electrodos compósitos, tales como baja corriente de fondo y gran versatilidad como consecuencia de la posibilidad de incorporar diferentes sustancias a la matriz electródica sin necesidad de enlaces covalentes. Además, constituyen un depósito tridimensional de enzima cuya superficie puede renovarse por simple pulido.

Como ejemplo de este diseño cabe citar la incorporación de nanopartículas de oro a una mezcla compósita de grafito en polvo y aceite de parafina utilizada para fabricar electrodos de pasta de carbono, así como de distintas enzimas. Con este diseño se ha construido un biosensor de glucosa de elevada sensibilidad sin necesidad de mediador [Liu S., 2003b], un biosensor de peroxidasa [Liu S., 2002] y uno de tirosinasa para la monitorización de fenol [Liu S., 2003a], todos ellos preparados mezclando la enzima, el oro coloidal y los componentes de la pasta de carbono. Un diseño similar se obtiene modificando micropartículas de carbono vitrificado con nanopartículas de oro y la enzima XOD para la detección de xantina e hipoxantina. Este dispositivo se empleó para la determinación de hipoxantina en atún [Çubukçu, 2007].

Una tendencia novedosa para la preparación de biosensores es el empleo de superficies nanoestructuradas de nanotubos de carbono (CNT) modificadas con nanopartículas de oro, ya que se obtienen dispositivos que mejoran su capacidad para la inmovilización estable de biomoléculas. De este modo, se obtienen materiales híbridos con una elevada estabilidad y capacidad de biosensorización. Los electrodos modificados con nanotubos de carbono exhiben efectos electrocatalíticos intensos hacia la oxidación de moléculas tales como NADH y peróxido de hidrógeno. En este contexto, en nuestro grupo de investigación, se ha preparado un biosensor compósito oro coloidal-CNT empleando Teflón como aislante, que proporciona una respuesta más sensible

hacia el peróxido de hidrógeno que la obtenida empleando otros electrodos compósitos, incluyendo los basados en CNT solamente. La incorporación de glucosa oxidasa a esta matriz permite preparar un biosensor de glucosa sin necesidad de mediador, alcanzándose una sensibilidad muy superior a la de otros biosensores de glucosa encontrados en la bibliografía. El valor de la constante de Michaelis-Menten, 14.9 mM, pone de manifiesto la elevada afinidad enzima-sustrato debido al adecuado microambiente que proporcionan las nanopartículas de oro [Manso, 2007]. Otra configuración semejante se basa en la inclusión de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en la misma matriz compósita, observándose un marcado incremento en la respuesta de oxidación de NADH comparada con la de otros biosensores. Así, la incorporación de ADH en el material electródico permite la obtención de un biosensor para la determinación de etanol con un límite de detección de 4.7  $\mu$ M [Manso, 2008].

Otra posibilidad es inmovilizar selectivamente las nanopartículas de oro a la superficie de nanotubos previamente funcionalizados. Por ejemplo, el empleo de agentes dispersantes, bien catiónicos, como polietilamina, bien aniónicos, como el citrato, cambia las propiedades ácidas o básicas de la superficie [Jiang, 2003]. De este modo, las nanopartículas de oro pueden unirse a los nanotubos por atracción electrostática. Un nanohíbrido de este tipo fue empleado por Liu y col. [Liu Y., 2005] para la inmovilización covalente de microperoxidasa (MP-11). La modificación de un electrodo de carbono vitrificado con una película del nanomaterial permite la transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo, sin observarse pérdida de su actividad biológica, proporcionando una respuesta electrocatalítica para la reducción de peróxido de hidrógeno. Otra configuración consiste en la unión covalente de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro a un electrodo de carbono vitrificado modificado con poli(tionina). El efecto sinérgico del

nanomaterial híbrido, unido a la excelente capacidad mediadora del polímero redox, permite el diseño de biosensores que proporcionan una rápida transferencia electrónica, además de una inmovilización más eficiente de la enzima en comparación con otras configuraciones basadas en el empleo de nanotubos de carbono o nanopartículas de oro de forma individual [Feng, 2007].

La tecnología sol-gel permite la preparación de redes tridimensionales adecuadas para la encapsulación de una gran variedad de biomoléculas. Los materiales sol-gel inorgánicos son particularmente atractivos para la fabricación de biosensores enzimáticos debido a las adecuadas condiciones ambientales empleadas en su preparación, su porosidad, alta estabilidad térmica e inercia química, y a que este tipo de material, a diferencia de muchos otros, no se hincha apreciablemente en disolución acuosa. Los materiales híbridos sol-gel obtenidos por encapsulamiento de nanopartículas de oro en la matriz son ampliamente utilizados para la preparación de biosensores. Como ejemplo, cabe citar la preparación de un biosensor de acetilcolinesterasa basado en un sol-gel tridimensional de silicato y nanopartículas de oro que proporciona un microambiente biocompatible, de forma que la enzima mantiene su actividad biológica, y se garantiza la inmovilización estable en la matriz. Este biosensor ha permitido la determinación sensible de pesticidas como metilparation y carbaril. Otras características de interés de este diseño es la exactitud de las medidas, la sencillez del procedimiento empleado, así como su bajo coste [Du, 2008].

Otra posibilidad consiste en combinar la tecnología sol-gel y las monocapas autoensambladas empleando alcóxidos de silicio tiolados. De esta forma, las nanopartículas pueden ensamblarse en el interior y en la superficie del sol-gel, incrementándose, de esta forma, el área activa del electrodo. Las

nanopartículas pueden actuar como centros de conducción y facilitar la transferencia electrónica [Jia, 2002]. Un diseño de biosensor nanoestructurado, que permite determinaciones de gran sensibilidad basado en el empleo de una configuración similar, es el que consiste en inmovilizar una enzima deshidrogenasa y nanopartículas de oro en una matriz sol-gel funcionalizada con una monocapa. Las nanopartículas de oro se unen a la matriz a través de los grupos tioles terminales de la monocapa, constituyendo una serie de nanoelectrodos autoensamblados a una red tridimensional. Las nanopartículas de oro catalizan la oxidación del NADH, lo que ha permitido la obtención de un límite de detección de 5 nM en ausencia de mediador. El electrodo muestra una excelente estabilidad operacional y se aplicó a la detección de lactato y etanol a un potencial de -5 mV [Jena, 2006]. Otro ejemplo es el biosensor de glucosa desarrollado por Zhong y col. que se basa en la formación de una doble capa bidimensional de mercaptopropiltrimetoxisilano (MPS) sobre un electrodo de oro. Para su preparación se sumerge el electrodo de oro en una disolución de MPS en etanol, formándose una monocapa sobre la superficie electródica; seguidamente se sumerge en una disolución de NaOH, teniendo lugar la polimerización de las unidades silano dando lugar a la formación de una red bidimensional. Una segunda capa silano se forma sumergiendo la superficie nuevamente en una disolución de MPS durante una noche. Las nanopartículas de oro fueron posteriormente quimisorbidas sobre los grupos silano de la segunda capa y finalmente la glucosa oxidasa se adsorbe sobre las nanopartículas de oro. El biosensor proporciona una excelente respuesta electrocatalítica para la glucosa empleando  $\text{Co}(\text{byp})_3^{3+}$  como mediador, obteniéndose un intervalo lineal de  $4.0 \times 10^{-10}$  a  $5.3 \times 10^{-8}$  M [Zhong, 2005].

La técnica "layer-by-layer" (LBL) resulta ser muy atractiva para la obtención de biosensores enzimáticos, habiéndose encontrado diseños muy

reproducibles, estables y muy sensibles. Así, Wu y colaboradores prepararon un biosensor amperométrico de glucosa basados en la formación de multicapas de glucosa oxidasa, quitosán y nanopartículas de oro empleando la técnica LBL. El dispositivo obtenido proporcionó una excelente actividad catalítica hacia la glucosa, demostrándose que las nanopartículas de oro mejoran notablemente la eficiencia del proceso de transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo [Wu, B.Y., 2007]. Otro diseño similar que emplea la técnica LBL se basa en la formación de multicapas de glucosa oxidasa / nanopartículas de oro sobre una superficie de oro modificada con cisteamina. En este caso se observó una correlación directa entre la respuesta bioelectrocatalítica y el número de bicapas depositadas, relacionado éste con la cantidad de enzima activa inmovilizada sobre el electrodo [Yang, 2006a].

Empleando la técnica LBL se ha preparado bicapas formadas por capas de dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) con nanopartículas de oro modificadas con hexacianoferrato de cobalto, alternadas con capas de ácido polivinilsulfónico sobre electrodos de óxido de indio-titanio (ITO). Seguidamente se inmovilizó la enzima glucosa oxidasa en presencia de albúmina de suero bovino y glutaraldehído como agente entrecruzante. La detección amperométrica de glucosa se llevó a cabo aplicando un potencial de 0 V vs. SCE [Crespillo, 2006]. Sun y colaboradores modificaron un electrodo de oro con multicapas de sulfonato modificadas con nanopartículas de oro/tionina basándose en interacciones de tipo electrostático y covalente. Estas superestructuras proporcionan una matriz ideal para la fabricación de sensores bienzimáticos, donde las moléculas de tionina actúan como mediador para la transferencia electrónica. Las enzimas glucosa oxidasa oxidada con periodato y peroxidasa se inmovilizaron covalentemente a la multicapa, obteniéndose un

biosensor con excelente respuesta electrocatalítica hacia la glucosa, que aumenta conforme aumenta el número de capas de tionina [Sun, 2007].

A continuación se describen de forma esquemática algunas aplicaciones de biosensores que emplean superficies electrónicas modificadas con nanopartículas de oro.

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ENZIMA/ ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
GOx / Oro	Inmov. covalente. de GOx oxidada-IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> y nAu y entrecruz. con cisteamina mediante la técnica LBL	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.25 V vs. SCE)	Reg. Fosfato 0.1 M, pH 6.8 + ferrocenometano 0.25 mM t <sub>respuesta</sub> = 4s	Glucosa	Inter. Lineal: 1.0x10 <sup>-5</sup> -1.3x10 <sup>-2</sup> M Sensibilidad: 5.72 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 8 μM Tiempo de vida útil: 4 semanas (85% respuesta inicial)	[Yang., 2006a]
GOx / Oro	Adsorc. de GOx sobre multicapas de (PDDA/nAu) <sub>n</sub> /PDDA depositadas sobre superf. de Au mediante la técnica LBL	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.3 V)	Reg. Fosfato 0.1 M, pH 7.0	Glucosa	Au/(PDDA/nAu) <sub>3</sub> /PDDA/GOx Sensibilidad: 5.2 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> Au/(PDDA/nAu) <sub>6</sub> /PDDA/GOx Sensibilidad: 13.6 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> Au/(PDDA/nAu) <sub>9</sub> /PDDA/GOx Sensibilidad: 22.6 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Zhang S., 2006]
GOx / Oro	Inmov. covalente de GOx a superf. mod. con nAu	CV y EIS Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.3V vs SCE)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 4.3 mM Reg. Fosfato pH 7.0	Glucosa	Inter. lineal: 2.0x10 <sup>-5</sup> -5.7x10 <sup>-3</sup> M Sensibilidad: 8.8 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 8.2 μM Tiempo de vida útil: 1 mes	[Zhang S., 2005]
GOx / Oro	Inmov. nAu y GOx sobre MPTS	EIS y CV vs. SCE	Reg. Fosfato 0.05 M + 1 mM Co(byp) <sub>3</sub> <sup>3+</sup> como mediador	Glucosa	Inter. Lineal: 4.0x10 <sup>-10</sup> -5.0x10 <sup>-8</sup> M LD: 1x10 <sup>-10</sup> M Tiempo de vida útil: 21 días	[Zhong, 2005]
GOx / Oro	Dep. electroquímica de biocompósito: Chitosan-GOx-nAu	Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.7 V)	Reg. fosfato 0.1M pH 7.4	Glucosa / Suero	Inter. lineal: 0.005 - 2.4 mM LD.: 2.7 μM	[Luo, 2004]
GOx / Oro	Inmov. covalente de GOx modif. con peryodato (IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -GOx) y HRP sobre multicapas de nAu/Thi	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.18 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 1.21mM	Glucosa y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Inter. lineal : 6.0x10 <sup>-6</sup> - 1.1x10 <sup>-3</sup> M Sensibilidad: 22.8 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 58 μM Glucosa: Inter. lineal : < 3 mM Sensibilidad: 3.8 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 35 μM	[Sun, 2007]
GOx / Oro	Técnica LBL para prep. multicapas de nAu/MWNT/GOx unidas por atracción electrostática a capas intercaladas de PDDA	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.2 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 10.6 mM	Glucosa	Inter. Lineal: < 9.9 mM LD: 128 μM	[Liu Y., 2007]

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ENZIMA/ ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
GOx / ITO	Inmov. de GOx por entrecruzam. con GA y BSA sobre superf. mod. con nAu mod. con dendrimeros de PANAM con hexaciano-ferrato de Co alternando capas de PVS	Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.0 V vs. SCE)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 2.03mM Reg. Fosfato 0.1 M + NaCl 0.05 M, pH 7.0	Glucosa	Inter. Lineal: < 1.5 mM Sensibilidad: 33.6 ± 0.2 nA mM cm <sup>-2</sup> LD: 17 μM	[Crespilho, 2006]
GOx / ITO	Inmov. de GOx por entrecruzam. con GA sobre superf. mod. con PVS y dendrimeros de PAMAM con hexaciano-ferrato de cobalto como mediador	Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.0 V vs. SCE)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 2.03 mM	Glucosa	Inter. lineal : Hasta 1.5 mM Sensibilidad:33.6 ± 0.2 nA mMcm <sup>-2</sup> LD: 17 μM	[Brett, 2006]
GOx / GCE	Inmov. de GOx y TTF (mediador) por entrecruzamiento con GA sobre superf. mod. con cisteamina ó MPA y nAu.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.2 V)	Reg. fosfato 0.05 M pH 7.4	Glucosa	Inter. lineal : 0.01 – 10 Mm Sensibilidad: 1.02 ± 0.06 mA/M LD.: 0.7 x 10 <sup>-5</sup> M Tiempo de vida útil: 28 días	[Mena, 2005a]
GOx / GCE	Inmov. mezcla de GOx-Chitosan-nAu sobre superf. mod. con película de azul de prusia.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.05 V)	Repetib.: 8.3% (RSD) Reg. fosfato 0.05 M pH 7.0+ 0.1 M KCl	Glucosa / Suero humano	Inter. lineal : 1.0x10 <sup>-6</sup> - 1.6x10 <sup>-3</sup> M Sensibilidad: 69.26 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup> LD: 6.9x10 <sup>-7</sup> M	[Xue, 2006]
GOx / GCE	Inmov. de GOx sobre superf. mod. con nAu. y recubrimiento con Nf.	CV Amperom. (E <sub>ap</sub> : 0.27 V vs. Ag/AgCl)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 4.6 mM Reg. fosfato 0.1 M pH 6.82 + 0.25 mM ferrocenometanol (como mediador)	Glucosa	Inter. lineal : ≥ 6 mM Sensibilidad: 6.5 μA mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD. 3.4x10 <sup>-5</sup> M Tiempo de vida útil: 2 semanas	[Zhao, 2006]
GOx / GCE	Inmov. de GOx mediante composito de nAu y n-fibras conductoras de polyanilina.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.5 V)	Repet. = 4.8 % (n=7) Reg. fosfato 0.1 M pH 6.9	Glucosa/ Suero y sangre	Inter. Lineal: 1.0x10 <sup>-6</sup> -8.0x10 <sup>-4</sup> M Sensibilidad: 2.3 mA/M LD: 5.0x10 <sup>-7</sup> M Tiempo de vida útil: 2 semanas	[Xian, 2006]

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ENZIMA/ ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
GOx /Electrodo microporoso de Au	Co-inmov. de GOx y nAu sobre superf. mod. con DL-Tiorfan/1,8octanoditiol	Amperom. ( $E_{ap}$ : +0.45 V)	Reg. fosfato 0.05 M pH 7.0	Glucosa	Inter. Lineal: < 22.0 mM	[Zhang F.H., 2006]
GOx / PC	Adsor. de GOx sobre superf. mod. con Au col.	CV	Const. de transferencia de carga: (38.9±5.3)/s Reg. fosfato 0.1M pH 5	Glucosa / Suero	Inter. Lineal : 0.04-0.28 mM Sensibilidad: 8.4 $\mu$ A/mM LD: 0.01 mM	[Liu S., 2003b]
GOx / CNT- Teflon compósito/	Incorp. de GOx y Au col. en la matriz compósita	Amperom. ( $E_{ap}$ :+ 0.5 V)	$K_{app}^m = 14.9$ mM Reg. fosfato 0.05 M pH 7.4	Glucosa/ Bebidas isotónica	Inter. Lineal: 0.05–1 mM Sensibilidad: 2.6 mA/M LD.: 17 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 3 meses	[Manso, 2007]
GOx / Pt	Inmov. de GOx sobre Au dep. sobre polivinilferroceno (PVF)	Amperom. ( $E_{ap}$ : +0.5 V vs. SCE)	Rep. = < 5% (RSD) $K_{app}^m$ (PVF-Au-GOx)= 30.40 mM Reg. fosfato 0.1 M pH 7.4	Glucosa/ Suero	Inter. Lineal: < 36 mM Sensibilidad: 4.17 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> Tiempo de vida útil: 15 días	[Sulak, 2006]
GOx / Pt	Inmov. de GOx sobre capas de quitosan y nAu dep. sobre superf. mod. con polianilina mediante la técnica LBL	Amperom. ( $E_{ap}$ : +0.6 V vs. Ag/AgCl)	$K_{app}^m = 10.5$ mM Reg. fosfato 0.1 M pH 6.8	Glucosa/ Suero humano	Inter. Lineal: 0.5-32 mM Tiempo de vida útil. 1 mes	[Wu B.Y., 2007]
HRP / Oro	Inmov. de HRP sobre superf. mod. con pelíc. de quitosan electrodep. y nAu	CV y EIS Amperom. ( $E_{ap}$ = -0.25V)	Mediador: Azul de metileno.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 0.008 - 15 mM LD: 2.4 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 4 semanas	[Luo, 2005]
HRP / Oro	Inmov. de HRP sobre superf. mod. con Au col. y cisteamina	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.3 V)	$K_{app}^m = 2.3$ mM. RSD: 3% (n=10) Reg. fosfato 0.1 M pH 7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 0.0014 - 2.8 mM LD.: 0.58 $\mu$ M	[Yi, 2000]
HRP / Oro	Inmov. de HRP sobre superf. mod. con Au col. inmov. sobre cisteamina-GA-cisteamina	Amperom. ( $E_{ap}$ : - 0.1V vs SCE)	$K_{app}^m$ decrece cuando disminuye el diametro de Au col/ Reg. fosfato 0.1 M pH 6.9	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 0.39 $\mu$ M-0.33 mM LD.: 0.15 $\mu$ M	[Xiao, 1999]

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ENZIMA/ ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
HRP / Oro	Inmv. HRP sobre nAu quimisorbidas sobre nanoesferas tioladas funcionalizadas con poli(estireno-co-ácido acrílico)	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V vs. SCE)	Repetib.= 1.7 % (n=9) Reprod.: 4.0 % Reg. fosfato 0.1 M pH 7.0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. Lineal: 8.0 $\mu$ M-7.0 mM LD: 4 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 60 días	[Xu S., 2006]
HRP / Oro	Adsorc. de HRP sobre nAu enlazadas a grupos tiol de película sol-gel	Amperom. ( $E_{ap}$ = -0.25 V)	RSD: 2.1 % (n=9)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 5 $\mu$ M-10 mM LD: 2 $\mu$ M Tiempo de vida útil 120 días.	[Jia, 2002]
HRP / Pt	Politionina embebida en película de Nf sobre superf. de Pt. HRP inmov. sobre nAu y gelatin sobre Nf.	Cronoamper.	RSD: 2.2% (n=5)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 0.05-30.6 mM LD: 0.02 mM	[Zhu, 2006]
HRP / Oro	Inmov. de HRP sobre nAu quimisorbidas sobre superf. mod. con nanoesferas funcionalizadas poly(DVB-co-AA)	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V)	Repetib.: 1.8 % (n=9) Reprod.: 4.7 % Reg. fosfato 0.1 M, pH 7.0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. Lineal: 1.0 $\mu$ M- 8.0 mM LD: 0.5 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 60 días	[Xu S., 2007]
HRP / ITO	Atrapam. de HRP sobre superf. mod. con chitosan – Au col.	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.51 V)	Repetib.: 1% (RSD) (n=34)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal : 0.01-0.5 mM LD: 5 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 7 días (almacenamiento)	[Lin J., 2007a]
HRP / GCE	Inmvo. HRP sobre superf. mod. con matriz sol-gel que contiene nanocomposito de carboximetil chitosan y nAu	Amperom. ( $E_{ap}$ : +0.4 V vs. SCE)	$K_{app}^m = 0.57$ mM Repetib.: 1.87% (n=6) Reproducib.: 6.8% (n=6) Reg. Fosfato 0.1 M, pH 7.0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 5 $\mu$ M- 1.4 mM Sensibilidad: $6.24 \times 10^{-4}$ A/M LD: 0.401 $\mu$ M	[Xu Q., 2006]
HRP / PC	Inmov. HRP sobre superf. mod. con Au col.	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.4 V vs. SCE)	Const. velocidad transf. de carga: $6.04 \pm 0.18s^{-1}$ $K_{app}^m = (3.7 \pm 0.7)$ mM Reg. fosfato 0.1 M pH 7.4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. Linel : 0.48-50 $\mu$ M LD.: 0.21 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 40 días (almacenamiento)	[Liu S., 2002]

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO/ ENZIMA	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
HRP / Screen Printed-grafito	Incorp. de nAu y HRP en matriz de quitosan e innov. sobre SPCE	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.4 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 1.3 mM Reprod.: 4.9 % (n=30) Reg. citrato 0.1 M, pH 6.5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 0.01-11.3 mM Sensib.: 0.176 nA/ μM LD: 0.65 μM Tiempo de vida útil: 30 días	[Tanguaram, 2007]
HRP / ITO	Innov. de HRP sobre superf. mod con APTMS y Au col.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.25 V)	Repetib.: 2.4% (RSD) (n=8) Reg. fosfato 0.05 M pH 7.0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal : 0.020 - 8 mM LD: 8.0 μM Tiempo de vida útil: 90 días	[Wang L. 2004]
HRP / ITO	Innov. de HRP y TMB (mediador) sobre superf. mod. con MPTS y nAu	CV Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.7 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 2.2 mM Repetib.: 2.7% (RSD) (n=8)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal : 0.005 - 1.5 mM LD: 1 μM	[Lin, J., 2007b]
HRP / GCE	Innov. de HRP sobre superf. mod. con nanocompósito L-cisteina-nAu sobre membrana de Nf.	CV	Repetib.: 4.7% (RSD) (n=5) Reg. fosfato 0.1 M pH 7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal : 1.60×10 <sup>-5</sup> - 1.10×10 <sup>-3</sup> M LD: 5.50×10 <sup>-6</sup> M	[Li X., 2006a]
HRP / GCE	Unión covalente de CNTs y nAu sobre película de politionina electropolim. sobre GCE. Innov. de la enzima por incub. en disolución 15 mg/mL de HRP durante 12 h. a 4 °C.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.4 V vs. SCE)	Reg. Fosfato 0.1 M, pH 7.0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 5 μM-7.0 mM LD: 3 μM	[Feng, 2007]
HRP / GCE	Electropolim. de p-ABSA sobre GCE. Adsor. de tionina y nAu e innov. de HRP	Cronoamperom. (E <sub>ap</sub> : -0.45 V)	Repet.: 2.8 % Reproducib.: 3.9 % Regulador acetato pH 7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inter. lineal: 2.6 μM-8.8 mM LD: 0.64 μM	[Gao, 2007]
LDH / Oro ADH / Oro	nAu enlazada a grupos tiol de MPTS sol-gel. e innov. de biocomposito de MPTS sol gel -HRP sobre superf.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.05 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> (Lactato) = 0.91 mM K <sub>app</sub> <sup>m</sup> (Etanol) = 2 mM Reg. Fosfato 0.1 M pH 7.2	Lactato, etanol	Lactato: Sensib.: 446.8 nA/mM LD.: 0.1 μM Etanol: Sensib.: 47 nA/mM LD: 20 μM	[Jena, 2006]

Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO/ ENZIMA	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
AChE / GCE	Inmov. de AChE sobre superf. mod. sobre compuesto de silica sol-gel con nAu ensambladas.	CV	RSD: 1.7 – 2.3 %	Pesticidas: monocrotophos, metilparation y carbaril)	Tiempo de vida útil: 30 días	[Du, 2008]
GOx, Cit.C ó Tyr / GCE	Inmov. de Cit. C, GOx ó Tyr sobre nanocompuesto de Au mod. con polipirrol	Amperom. Tyr: E <sub>ap</sub> : -0.15V GOx: E <sub>ap</sub> : +0.7V	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> (Tyr) = 48 µA Reg. fosf. 0.1 M pH 6.5 K <sub>app</sub> <sup>m</sup> (GOx) = 43 µM Reg. fosf. 0.1 M pH 7.4	Fenol y glucosa	<i>Fenol</i> : Inter. Lineal: 1.0 – 20 µM Sensibilidad: 497.1 mA/M LD: 3×10 <sup>-8</sup> M <i>Glucosa</i> : Inter. Lineal: (0.05 – 0.6) mM Sensibilidad: 1.089mA/M LD: 2×10 <sup>-6</sup> M	[Nagy, 2007]
AChE / Oro	Adsorc. de AChE sobre superf. mod. con Au col. electrodep.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.68V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 0.18 ± 0.02 mM Reg. fosfato 0.1 M pH 8	Tiocolina Carbofuran	Inter. lineal: 10–135 nM LD: 33 nM Tiempo de vida útil: 7 días	[Shulga, 2007]
ADH / CNT-teflon compuesto	Incorp. de ADH y Au col en la matriz compósita	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.3 V)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 4.95 mM Reg. fosfato 0.05 M pH 7.4	Etanol/ Cerveza	Etanol Inter. Lineal: 0.02-1.0 mM Sensibilidad: 2.27 µA/mM LD: 4.7 µM Tiempo de vida útil: 1 mes (almac.)	[Manso, 2008]
XOD/GCPE-nAu	Atrapam. de XO en superf. compósita GCPE (80:20 % w/w) mod. con nAu	CV y Cronoamp. +0.7V	Rep. (X): 6.31% (RSD) 5 µM (n = 5) Rep. (Hx): 3.57% (RSD) 80 µM (n=5)	Hipoxantina (Hx) y Xantina (X)/ Atún	X: Inter. Lineal: 5.0×10 <sup>-7</sup> -1.0×10 <sup>-5</sup> M Sensibilidad: 0.24 µA / µM Hx: Inter. Lin.: 5.0×10 <sup>-6</sup> - 1.5×10 <sup>-4</sup> M Sensibilidad: 0.14 µA / µM	[Çubukçu, 2007]
ADH / Oro	Inmov. de ADH sobre superf. mod. con Au col. adsorb. sobre monocapas de 1,6-hexanoditiol	PCQ CV EIS	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 6.03 × 10 <sup>-4</sup> M Reg. fosfato 0.1 M pH 7.4 + 0.1 M NaCl	Etanol	Inter. Lineal: 1.0×10 <sup>-5</sup> -1.3×10 <sup>-2</sup> M LD: 8.0×10 <sup>-6</sup> M	[Liu Y., 2003]
XOD / PC	Inmov. de XOD por entrecruzam. con GA y BSA sobre superf. mod. con nAu.	Amperom. (E <sub>ap</sub> : +0.6 y 0.00 V vs. Ag/AgCl)	K <sub>app</sub> <sup>m</sup> = 18×10 <sup>-6</sup> M	Hipoxantina / Sardina y pollo	Inter. Lineal: 0.5–10 µmol L <sup>-1</sup> Sensib.: (2.29 ± 0.03)×10 <sup>4</sup> µA / M LD: 2.2×10 <sup>-7</sup> M	[Agüi, 2006]

**Tabla 2.- Biosensores enzimáticos basados en el empleo de nanopartículas de oro.**

ELECTRODO /ENZIMA	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
XOD / Oro	Atrapam. de XOD en pPy por electrooxidación y adsorc. de nAu sobre superf. mod. Azul de	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V)	$K_{app}^m = 43.2 \mu\text{M}$ Mediador: Azul de Prusia	Xantina	Inter. Lineal: 1-20 $\mu\text{M}$	[Liu, Y., 2004]
Tir / PC	Immov. de Tyr sobre superf. mod. con Au col.	CV y Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V)	$K_{app}^m = (54 \pm 3) \mu\text{M}$ Reg. fosfato 0.1 M pH 7	Fenol	Inter. Lineal : 4 - 48 $\mu\text{M}$ Sensibilidad: 12.3 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ LD: 6.1 nM	[Liu S. 2003a]

*Abreviaturas:* AChE: acetilcolinesterasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, ASV: voltamperometría de stripping anódico, Cit C: citocromo C, CNT: nanotubo de carbono, CPE: electrodo pasta de carbono, CV: Voltamperometría cíclica, DPV: Voltamperometría diferencial de impulsos, EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica, GA: glutaraldehído, GC: carbono vitrificado, GCE: electrodo de carbon vitrificado, GCPE: electrodo pasta de carbono vitrificado, GA: glutaraldehído, Hb: hemoglobina, HRP: peroxidasa, ITO: óxido de indio y titanio,  $K_{app}^m$  : constante aparente de Michaelis–Menten, LBL: layer-by-layer, LD: limite detección, MPTS: (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, MWNT: nanotubos de carbono de pared múltiple, nAu: nanopartículas de oro, p-ABSA: p-aminobenzene sulfonic acid, PCQ: piezoelectric quartz cristal, PDDA: cloruro de poli(dialildimetilammonio), pPy: polipirrol, PVB: polivinil butiral, PVS: ácido poli(vinilsulfónico), SCE: electrodo saturado de calomelanos, TMB: tetrametilbencidina, TTF: tetratiafulvaleno; Tir: tirosinasa, XOD: xantina oxidasa.

### ***I.4.2. Inmunosensores electroquímicos***

Hoy en día, los inmunosensores electroquímicos constituyen una importante herramienta analítica en diferentes campos, tales como el análisis de alimentos, clínico y medioambiental [Lei, 2003]. Las diversas configuraciones de inmunosensores electroquímicos constituyen excelentes alternativas por su alta sensibilidad, bajo coste y facilidad de miniaturización.

El desarrollo de inmunosensores se basa en la inmovilización del biomaterial anticuerpo o antígeno sobre una superficie transductora, siendo esta la etapa crucial a la hora de llevar a cabo su preparación. Los materiales electródicos empleados más comúnmente para la fabricación de los inmunosensores son platino, oro, carbono vitrificado, pasta de carbono, así como electrodos serigrafiados (“screen printed”). En cuanto a la inmovilización de las biomoléculas, los procedimientos más utilizados implican unión covalente, adsorción o el atrapamiento del biomaterial en la matriz.

Generalmente la adsorción directa de biomoléculas sobre superficies electródicas genera su desnaturalización o pérdida de su bioactividad. Sin embargo, se ha demostrado que macromoléculas, tales como anticuerpos, antígenos y enzimas, retienen su actividad cuando son inmovilizadas sobre superficies modificadas con nanopartículas, ya que éstas proporcionan un ambiente similar a su entorno natural. Además las partículas metálicas actúan como medio de conducción electrónico, facilitando la transferencia electrónica, permitiendo alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad [Luo, 2004a].

Se han encontrado en la literatura reciente numerosos ejemplos de inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro. Un ejemplo significativo es el inmunosensor amperométrico desarrollado para la detección del virus de la hepatitis B. Para su preparación, Tang y col.

inmovilizaron el anticuerpo HBsAb sobre un electrodo de platino modificado con oro coloidal y polivinil butiral [Tang, 2004b]. Estudios realizados mediante la técnica de espectroscopia electroquímica de impedancias (EIS), permitieron demostrar que el empleo de nanopartículas de oro dio lugar a una mayor superficie específica del biosensor, consiguiéndose mejores límites de detección. La determinación de este mismo antígeno fue llevada a cabo por Wang y col., con un inmunosensor basado en el empleo de una superficie de oro modificada con una monocapa de 4-aminotiofenol y oro coloidal. La cinética del proceso de reconocimiento antígeno-anticuerpo fue también monitorizada por EIS [Wang M., 2004].

Más recientemente, Tang y col. utilizaron diferentes superficies electrónicas y diseñaron nuevas estrategias para la preparación de inmunosensores para la detección del antígeno de la Hepatitis B. En la primera de ellas, el anticuerpo fue adsorbido electrostáticamente sobre multicapas de nanopartículas de oro y  $Co(bpy)_3^{3+}$  consiguiéndose buenos límites de detección tanto por amperometría como por potenciometría [Tang, 2005b]. Cuando el anticuerpo de la Hepatitis B se inmovilizó sobre una superficie de oro, modificada con nanopartículas de oro unidas a los grupos tioles de una película sol-gel previamente modificada, se obtuvieron mejores características analíticas [Tang, 2006a]. Este último diseño está basado en un inmunosensor amperométrico previamente preparado por el grupo de Liang y col. en el cual las nanopartículas de oro fueron quimisorbidas sobre una superficie de oro previamente modificada con un sol-gel de mercaptopropiltrimetilsilano, obteniéndose un inmunosensor con un tiempo de vida de 30 días sin observarse pérdida apreciable de sensibilidad. El mismo inmunosensor, preparado en ausencia del material nanoestructurado, muestra una disminución de la señal del 30%, por lo que la buena estabilidad se atribuyó a la presencia de las nanopartículas [Liang, 2005]. Otro diseño encontrado en la bibliografía para la

preparación de un inmunosensor de Hepatitis B, se basa en la inmovilización del anticuerpo sobre un electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro y peroxidasa (HRP) [Zhuo, 2005a]. Este inmunosensor emplea HRP en lugar de albúmina de suero bovino (BSA) como bloqueante de los sitios activos de la superficie electródica, consiguiéndose de este modo, además de evitar posibles adsorciones inespecíficas, la amplificación de la respuesta de la reacción antígeno-anticuerpo.

La técnica de autoensamblaje y la metodología de la adsorción se han combinado para la inmovilización del anticuerpo de la difteria y la preparación de un inmunosensor para la determinación del antígeno correspondiente. El anticuerpo anti-difteria se inmovilizó sobre una mezcla de nanopartículas de oro y nanopartículas de sílice depositadas sobre una superficie de platino previamente modificada con polivinilbutiral. La detección se basa en la diferencia de la respuesta potenciométrica antes y después de la reacción antígeno-anticuerpo, poniendo de manifiesto que el inmunosensor basado en el empleo de nanopartículas de oro y nanopartículas de sílice exhibe una mayor sensibilidad, mejor reproducibilidad, así como una mayor estabilidad que los preparados empleando un sólo nanomaterial [Tang, 2005a].

Se han diseñado inmunosensores para la determinación de  $\alpha$ -1-fetoproteína (AFP). La importancia de la determinación de este compuesto se debe a su interés en diagnósticos clínicos, ya que es empleado comúnmente como marcador de células tumorales. En la primera de las estrategias utilizada, el anticuerpo  $\alpha$ -1-fetoproteína se inmoviliza sobre una superficie de oro modificada con una mezcla compósita de tironina y Nafion con nanopartículas de oro. Seguidamente, el inmunosensor se incubó en una disolución de AFP, midiéndose, la disminución de corriente al aumentar la concentración de AFP mediante voltamperometría cíclica. Empleando esta configuración se alcanzó

un límite de detección del orden de nanomolar [Zhuo, 2005b]. Más recientemente, estos mismos autores diseñaron un nuevo inmunosensor amperométrico basado en el empleo de multicapas de nanopartículas de oro y tionina para la inmovilización de los anticuerpos sobre una superficie de oro previamente modificada con Nafion. En esta configuración, se emplea HRP como agente bloqueante de la superficie electródica para evitar adsorciones inespecíficas [Zhuo, 2006].

Los electrodos de carbono vitrificado han sido extensamente utilizados para la preparación de inmunosensores amperométricos. Su modificación con nanopartículas de oro proporciona una superficie adecuada para la inmovilización de anticuerpos sin producirse pérdida de su actividad. Así, la modificación de la superficie electródica con ácido polisulfanílico y azul de toluidina permite la unión de nanopartículas de oro y la posterior inmovilización del anticuerpo, para llevar a cabo la determinación del antígeno carcinoembriónico [Li X., 2006b].

Otro ejemplo de inmunosensor preparado con un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas, es el empleado para la determinación del antígeno carcinoma 125. En este caso, el anticuerpo se inmoviliza sobre oro coloidal estabilizado con una membrana de acetato de celulosa. La combinación de las nanopartículas de oro y la membrana de acetato de celulosa hace posible la inmovilización del anticuerpo, obteniéndose un inmunosensor sensible y selectivo para este tipo de antígeno [Wu L., 2006]. Este mismo anticuerpo ha sido inmovilizado por el grupo de Tang y col. sobre una interfase de pasta de carbono modificada con nanopartículas de oro y tionina obteniéndose buenos resultados. [Tang, 2006b].

Entre los materiales inorgánicos empleados para la fabricación de inmunosensores, cabe destacar los derivados sol-gel. Las ventajas que presentan

este tipo de superficies están relacionadas con su porosidad, su alta estabilidad térmica y baja reactividad química, así como la práctica ausencia de hinchamiento en medios acuosos. El empleo de estas matrices electródicas permite el atrapamiento de los biomateriales, pero presenta el inconveniente de una mayor pérdida de su bioactividad. En estos casos es particularmente atractivo el empleo de nanopartículas de oro, ya que, como se ha comentado anteriormente, su presencia proporciona un ambiente similar al estado natural de la molécula biológica, manteniéndose sus propiedades. Además, la presencia de las nanopartículas proporciona una mayor área activa, lo que conlleva una mayor densidad de anticuerpos inmovilizados, y una mayor sensibilidad. Esta estrategia ha sido empleada por Wu y col. para la preparación de un inmunosensor de inmunoglobulina G y su determinación en suero humano, consiguiéndose un amplio intervalo lineal y una buena selectividad [Wu Z.S, 2005].

Un ejemplo en el que se combina el empleo de nanopartículas de oro para la inmovilización de biomoléculas y su utilidad como marcador electroquímico, es el inmunosensor desarrollado por Chen H. y col. para la determinación de inmunoglobulina G humana. La técnica de detección empleada fue la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), consiguiéndose una amplificación de la señal por deposición secuencial de inmunoglobulina G e inmunoglobulina G marcada con nanopartículas de oro. Para la preparación del inmunosensor los anticuerpos fueron inmovilizados sobre una superficie de oro previamente modificada con una monocapa de 1,6-hexanoditiol (HDT) y con nanopartículas de oro alcanzándose un límite de detección de  $4 \text{ ng mL}^{-1}$  [Chen H, 2006].

En la *Tabla 3* se recogen los ejemplos más significativos de diseños de inmunosensores basados en el empleo de nanopartículas de oro, mostrándose

de forma esquemática aspectos relevantes como su preparación y su aplicación a la determinación de diferentes analitos de interés.

Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Platino	Inmov. del Ab de difteria sobre Pt mod. con Au col. y PVB y bloqueo con BSA	CV y EIS Potenciom.	Reg. fosfato pH 7 + KCl 0.1 M	Antígeno Difteria	Interv. concentrac.: 24-1280 ng mL <sup>-1</sup> LD: 7.8 ng mL <sup>-1</sup>	[Tang 2005a]
Platino	Inmov. de antisuero de encefalitis Japanese B sobre Pt mod. con PDA y nAu y azul de Prusia (mediador). Bloqueo con BSA	Amperom.	Ensayo directo/ Reg. fosfato 25 mM pH 7.4	Japanese B encephalitis vaccine	Interv. concentrac.: (1.1-190) x 10 <sup>-8</sup> lg pfu mL <sup>-1</sup> LD: 6 x 10 <sup>-9</sup> lg pfu mL <sup>-1</sup>	[Yuan, 2005]
Platino	Inmov. del Ab de la difteria sobre Pt mod. con Au col. y. PVB	CV y EIS Potenciom.	Reg. fosfato pH 7.0 + KCl 0.1 M	Antígeno Difteria/ Suero humano	Interv. concentrac.: 4.4-960 ng / mL LD: 2.4 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 4 meses	[Tang, 2004a]
Platino	Inmov. del Ab de difteria sobre Pt mod. con Au col. y PVB	CV y EIS	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> en reg. fosfato pH 7.4	Antígeno Hepatitis B/ Suero humano	Interv. concentrac.: 20-160 ng mL <sup>-1</sup> LD: 7.8 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 1 mes	[Tang, 2004b]
Platino	Inmov. del Ab de Hepatitis B sobre superf. mod. con nAu, Nf y gelatina	Potenciom.	Ensayo directo/ Reg. fosfato 0.1 M pH 7.4	Hepatitis B/ Suero humano	Interv. concentrac.: 4-800 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.3 ng mL <sup>-1</sup>	[Tang, 2004c]
Platino	Adsorc. de Ab sobre mezcla de nAu-nSiO <sub>2</sub> y atrapam. en PVB sol-gel	Potenciom.	Reg. fosfato, pH 7.0	Toxina de la difteria	Interv. concentr.: 5.0x10 <sup>-3</sup> -1.2 µg mL <sup>-1</sup> LD: 1.1x10 <sup>-3</sup> µg mL <sup>-1</sup>	[Tang 2005a]
Platino	Inmov. del Ab de Hepatitis B sobre superf. mod, con (Co(bpy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup> ), nAu y Nf	Potenciom. Amperom.	Reg. fosfato pH 7.0	Hepatitis B/ Suero humano	Interv. concentrac.: 0.05-4.5 µg mL <sup>-1</sup> LD (Amperom.): 0.005 µg mL <sup>-1</sup> LD (Potenciom.): 0.015 µg mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 1 mes	[Tang 2005b]

Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Platino	Inmov. del Ab sobre superf. mod. con DTSP, poli(amido-amina) dendrimero y nAu ó nanopartículas de sílica ó SiO <sub>2</sub> /nAu	CV	Reg. fosfato 10 mM pH 7.0	IgG / Suero humano	Interv. concentrac.: 5.0-9600 µg mL <sup>-1</sup> LD: 0.8 ng mL <sup>-1</sup>	[Tang 2005d]
Platino	Adorc. del Ab de difteria sobre mezcla de nAu-SiO <sub>2</sub> y atrapam. en sol-gel de PVB	Potenciom.	Reg. Fosfato, pH 7.0	Difero toxina	Interv. concentrac.: 4.4-960 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.1x10 <sup>-3</sup> µg mL <sup>-1</sup>	[Tang y Ren, 2005]
Oro	Inmov. del Ab de Hepatitis B sobre superf. mod. con MPS-sol gel y Au coloidal	Potenciom.	Reg. fosfato pH 7.4	Antígeno Hepatitis B/ Suero humano	Interv. concentrac.: 4-960 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.9 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 1 mes	[Tang, 2006a]
Oro	Inmov. anti-IgG sobre superf. mod. con mercaptoetilamina y nAu	Potenciom.	Repet.: 5.9 % Reg. Fosfato pH 7	IgG/ Suero	Interv. concentrac.: 12-800 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3.4 ng mL <sup>-1</sup>	[Fu, 2005]
Oro	Inmov. anti-AFP sobre superf. mod. con n-Au membrana de Nf y Thi. Bloqueo de super. con BSA	CV y Amperom.	HAc-NaAc 0.1 M pH 5.5 + KCl 0.1 M	α-fetoproteína/ Suero humano	Interv. concentrac.: 5.0-200 ng mL <sup>-1</sup> LD: 2.4 ng mL <sup>-1</sup>	[Zhuo, 2005a]
Oro	Inmov. del Ab de Hepatitis sobre superf. mod. con Au col. Thi y Nf. Bloqueo superf. con BSA ó HRP	Amperom.	Repet.: 3.8 % (n=50) HAc-NaAc 0.1 M pH 6.5 + 0.27 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hepatitis B	Interv. concentrac. (con BSA): 5.12 – 512 ng mL <sup>-1</sup> Interv. concentrac. (con HRP): 2.6-563 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.85 ng mL <sup>-1</sup>	[Zhuo, 2005b]
Oro	Adsor. electrost. de n-Au y Thi sobre membrana de Nf y HRP	Amperom.	HAc-NaAc 0.1 M pH 5.5 + 0.1 M KCl	α-1-fetoproteína/ Suero Humano	Interv. concentrac.: 1-250 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.56 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 3 meses	[Zhuo, 2006]

Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Oro	Inmov. del Ab sobre Au modif. con Au col. y 1,6-hexaneditiol. Bloqueo de superf. con BSA	EIS Amplific. señal por dep. secuenc. de IgG y antiIgG-Au	Ensayo tipo sándwich/ 20mM PBS + 0.1M KCl, 5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] /K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], pH 7.4	IgG humana	Interv. concentrac.: 15.3-328.3 ng L <sup>-1</sup> LD: 4.1 ng L <sup>-1</sup>	[Chen H, 2006]
Oro	Inmov. del Ab de Hepatitis B sobre superf. mod. con MPS sol-gel y nAu quimisorbido	DPV y Amperom.	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5 mM+ KCl 0.1 M + Reg. Fosfato 0.05 M	Antígeno Hepatitis B/ Suero humano	Interv. concentrac.: 2-360 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.2 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 30 días	[Liang, 2005]
Oro	Anti-CEA inmov. sobre nAu-MPTS sol-gel	Potenciom.	Reg. fosfato pH 7.4	Antígeno Carcinoembrionario (CEA)	Interv. concentrac.: 4.4-85.7 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.2 ng mL <sup>-1</sup>	[An, 2007]
Oro	Inmov. de Ab de Hepatitis sobre sup. mod. con 4-amino-tiofenol y Au col.	CV y EIS	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> 2.5 mM+ Reg. fosfato 0.02 M pH 7.4	Hepatitis B	Interv. concentrac.: 0.5-200 µg L <sup>-1</sup> LD: 50 ng L <sup>-1</sup>	[Wang M., 2004]
Oro	Inmov. de Ab de IgG humano sobre superf. mod con MPTS sol-gel y nAu. Bloqueo con BSA	CV y EIS	Ensayo directo / Reg. Fosfato 10 mM pH 7.4 + Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> 5mM	IgG/ Suero humano	Interv. concentrac.: 8.3-2128 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3.3 ng mL <sup>-1</sup>	[Wu Z.S, 2005]
Oro	Inmov. anti-PSA sobre superf. mod. con película de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> sol-gel y nAu	Potenciom.	Ensayo directo / Reg fosfato pH 7.4	PSA/ Suero humano	Interv. concentrac.: 4.0-13 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3.4 ng mL <sup>-1</sup>	[Liu Y., 2008]

Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Microelectrodos Au	Inmov. anti-AFP sobre superf. Au mod. con Cys / 1,6-Hexaneditiol y Au col. Bloqueo superf. con BSA	Cronoamperom ( $E_{ap}$ : -0.4 V)	Ensayo tipo sándwich Reg. fosfato 10 mM pH 7.4	$\alpha$ -fetoproteína (AFP) / Suero	Interv. concentrac.: 15-350 ng mL <sup>-1</sup> LD: 5 ng mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 90 días	[Xu Y, 2006]
Superficie de Oro	Incub. anti-CEA sobre superf. mod. con MPA, hidroxil-amina y nAu, e incub. en BSA	QCM	Reg. fosfato 0.1 M pH 7.0	Antígeno Carcinoembrió-nico (CEA) / Suero	Interv. concentrac.: 3-50 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.5 ng mL <sup>-1</sup>	[Tang, 2006c]
Carbono vitrificado	Inmov. CA125 sobre Au col. estabilizado con membrana de acetato de celulosa	DPV	Ensayo competitivo/ Reg. Fosfato 0.1 M pH 5.5	Carcinoma 125/ Suero humano	Interv. concentrac.: 0-30 U mL <sup>-1</sup> LD: 1.73 U mL <sup>-1</sup>	[Wu L., 2006]
Carbono vitrificado	Incub. de anti-IgG sobre sup. mod. con película de Au electrodep. e incub en BSA	EIS	Ensayo tipo sándwich / $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ 10 mM en KCl 0.1 M	IgG	Interv. concentrac.: 0.011-11 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.009 ng mL <sup>-1</sup>	[Chen Z., 2005]
Carbono vitrificado	Inmov. del Ab de paraoxon sobre GCE mod. con Au col y película de Nf	CV Potenciom.	Directa/ Reg. fosfato 0.01 M pH 7 + NaCl 0.05 M	Paraoxon/ Aguas	Interv. concentrac.: 24-1920 $\mu$ g L <sup>-1</sup> LD: 12 $\mu$ g L <sup>-1</sup>	[Hu, 2003]
Carbono vitrificado	Atrapamiento de HRP-anti-hCG/nAu en membrana sol-gel	DPV EIS	Reg. fosfato 0.1 M pH 7.1	Gonadotropina coriónica humana (hCG) / Suero	Interv. concentrac.: 0.5-5.0 mIU mL <sup>-1</sup> 5.0-30 mIU mL <sup>-1</sup> LD: 0.3 mIU mL <sup>-1</sup>	[Chen J., 2006]
Carbono vitrificado	Adsorc. de Ag de Sj sobre pocillo de poliestireno e inmov. de Ab de Sj	Det. de Ag <sup>+</sup> mediante ASV sobre GCE	Directo / 0.6 M KNO <sub>3</sub> + 0.1 M HNO <sub>3</sub>	Schistosoma japonicum (Sj) / Suero conejo	Interv. concentr.: 6.4 ng mL <sup>-1</sup> -100 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> LD: 3 ng mL <sup>-1</sup>	[Chu, 2005a]

Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Carbono vitrificado	Adsorc. de anti-IgG sobre pocillo (microwell) de poliestireno	Det. de Ag <sup>+</sup> mediante ASV sobre GCE	Ensayo tipo Sándwich: incub. IgG+anti-IgGnAu Ads. de Ag <sup>+</sup> sobre nAu, redisol.	IgG/ Suero humano	Interv. concen.: 1.7 ng mL <sup>-1</sup> -27.2 µg mL <sup>-1</sup> LD: 1 ng mL <sup>-1</sup>	[Chu, 2005b]
Carbono vitrificado	Incub de anti-CEA, sobre GCE mod. con PSAA, TB y nAu col. Bloqueo con HRP ó BSA	Amperom.	Reg. fosfato 0.1 M pH 6.5 + 0.1 M KCl	CEA (analito modelo)	Interv. concentrac. (con BSA): 0.5-5.0 ng mL <sup>-1</sup> y 5.0-120 ngmL <sup>-1</sup> Interv. concentrac. (con HRP): 0.5-5.0 ng mL <sup>-1</sup> y 5.0-120 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.2 ng mL <sup>-1</sup>	[Li X, 2006b]
Carbono vitrificado	Inmov. del Ag de los alérgicos de los ácaros del polvo sobre superf. mod. con nAu electrodepositadas.	EIS	Inc. en el anticuerpo murine y medida de EIS en 2.5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] + 2.5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] + 0.1 M KCl en 20 mM pH 7.4 PBS.	Alérgicos de los ácaros del polvo	-	[Huang, 2007]
Carbono vitrificado y oro	Dep. del Ab modific. con sales de diazonio	Cronoamp. (E <sub>ap</sub> :0V)	Ensayo tipo sándwich / Dep. de citosina y del Ab biotinilado. Inc. en ExtraAvidina-HRP Empleo de 3,3,5,5-tetrametibencidina como mediador	cytokine	Interv. concentrac.: 0.1-100 ng mL <sup>-1</sup> LD.: 46 pg mL <sup>-1</sup>	[Polsky, 2008]
Carbono vitrificado	Inmov de anti-CA15-3 sobre superf. mod. con nAu, RBC y película de Au	CV	Ensayo Competitivo/ Reg. fosfato pH 7.4 + 1.0 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CA15-3/ Suero humano	Interv. concentrac.: 2.5-120 U mL <sup>-1</sup> LD: 0.5 U mL <sup>-1</sup>	[Tang, 2007]
Carbono vitrificado	Inmov. del Ab de CA125 sobre superf. mod. con microesferas porosas y PTH	Amperom.	2.5 mM de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> + 0.1 M KCl en 20 mM de reg. fosfato de pH 7.4	Antígeno Carbohidrato CA 125	Interv. de concentr.: 4.5-36.5 U mL <sup>-1</sup> LD: 1.3 U mL <sup>-1</sup>	[Fu, 2007]

**Tabla 3.- Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.**

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Pasta de carbono	Adsorc. Ab sobre sup. e incub. en BSA Au col. como marcador	ASV	Ensayo tipo Sándwich/ Reg. fosfato 0.05 M pH 7.4	hIgG/ Suero humano	Interv. concentrac.: 10-500 ng mL <sup>-1</sup> LD: 4.0 ng mL <sup>-1</sup>	[Chen Z., 2007]
Pasta de carbono	Atrapam. de nAu en matriz de quitosan sobre el electrodo y mod. con SjAb	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.3 V)	Ensayo Competitivo secuencial/ Reg. fosfato 0.067M pH 6.98	Schistosoma japonicum (analito modelo)	Interv. concentrac.: 0.11-22.4 µg mL <sup>-1</sup> LD: 0.06 µg mL <sup>-1</sup>	[Lei, 2003]
Pasta de carbono	Incorp. de Ab y nAu a la matriz	CV, EIS y DPV	Medida disminución corriente de pico por la interac. Ag-Ab/ PBS pH 7.0	CA19-9/ Suero humano	Interv. concentrac.: 2-30 U mL <sup>-1</sup> LD: 1.37 U mL <sup>-1</sup> Tiempo de vida: 10 días	[Dan, 2007]
Pasta de carbono	Inmov. de anti-IgG sobre un pocillo e inc. en IgG durante 1 h a 37 °C	ASV para determinar el contenido de oro	Ensayo tipo Sándwich / antiIgG secundario marcado con dethiobiotina. Post. reacción con biotina modif. con partículas magnéticas sobre Avidina-nAu Dis. del Au en HBr/Br <sub>2</sub>	hIgG	Interv. concentrac.: 0.2-5 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.1 ng mL <sup>-1</sup>	[Mao, 2007]
Microelectrodo Au (digitalizado)	Incub. de anti-AFB <sub>1</sub> sobre superf. mod. con nAu y AET, bloqueo superf. con HRP	Conductim.	Reg. Fosfato 0.02M pH 7.0 + 0.05 M KI, 80 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0.15 M NaCl	AFB <sub>1</sub>	Interv. concentrac.: 0.5-10 ng mL <sup>-1</sup> LD:0.1 ng mL <sup>-1</sup>	[Liu Y., 2006]
Screen-Printed de grafito	Ab inmov. sobre un pocillo de una placa	CV	Ensayo tipo sándwich / Ab secundario marcado con nAu. Oxidación electroq. del oro con HBr/Br <sub>2</sub>	Mioglobina, troponina y creatina quinasa	-	[Piras, 2005]

**Tabla 3.-** Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro.

ELECTRODO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	DETECCIÓN	PARAMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Scren-Printed de grafito	Inmov. de anti-IgG sobre un pocillo, incub. en IgG, y unión del conjugado anti-goat-IgG marcado con Au col.	ASV	Ensayo tipo Sándwich/ Ab secundario marcado con nAu. Oxidación electroq. del oro con HBr/Br <sub>2</sub> Reg. fosfato, pH 7.4	IgG de cabra	Interv. concentrac.: 0.5-100 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3 pM	[Dequaire, 2000]
Electrodos de Ag serigrafiados sobre nitrocelulosa mod. con polianilina	Inmov. cov. de anti-HSA sobre superf. mod. con nAu con polianilina	Conductim.	Ensayo tipo sándwich / Ab secundario marcado con Au. Cuantif. del oro	Albúmina suero humano	-	[Kim, 2000]

*Abreviaturas:* BSA: albúmina de suero bovino, CPE: electrodo pasta de carbono, DTSP: 3-3'-Ditio-bis(ácido propionico/N-hidroxisuccinimida), Fc-CHO: ferrocenocaraldehído, GCE: electrodo carbono vitrificado, HAsAb: Anticuerpo Hepatitis B., HbsAg: antígeno del Hepatitis B., MPS: mercaptopropiltrimetoxilano, MPTS: mercaptopropiltriétoxilano, Nf: nafion, nAu: nanopartículas de oro, PDA: o-fenilendiamina, PSA: antígeno específico de la próstata, PTH: politionina, PVB: polivinilbutiral, SAM: monocapa autoensamblada, TRIS: tris(hidroximetil)aminometano, Thi: tionina

## I.5 ANALITOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### I.5.1 *Compuestos fenólicos*

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Generalmente se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol [Serra, 2002].

Son compuestos altamente tóxicos, carcinogénicos y alergénicos. Su toxicidad varía con el número de sustituyentes y su posición en el anillo aromático. Debido a su alta toxicidad y persistencia en el medio ambiente, el fenol y especialmente sus derivados clorados, nitrados y alquilados se han definido como contaminantes peligrosos y están incluidos en la lista de sustancias peligrosas y contaminantes prioritarios de la Comunidad Europea (CE) y de la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (EPA)

La presencia de fenoles en el medio ambiente es consecuencia tanto de acciones naturales como del aporte antropogénico, generalmente de carácter industrial. Desde el punto de vista de la contaminación, es de gran importancia la presencia de estos compuestos en aguas y sedimentos, debido a su elevada toxicidad, siendo empleados en diferentes tipos de industrias, como textiles, plásticos, colorantes, tintas, medicamentos, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, etc. [Soares-Rosatto, 2001]. Por tanto, es necesario prestar interés al origen, migración y distribución de estos compuestos en el medio ambiente, así como contar con métodos fiables para su determinación en matrices complejas [Wang, 1994].

Por lo que se refiere a los polifenoles, son compuestos constituidos por al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes.

En el ser humano, tras su ingesta, parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular, proporcionando importantes beneficios para la salud. Entre sus propiedades más relevantes cabe destacar su capacidad para *inhibir* los procesos oxidativos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) reduciendo los riesgos de enfermedades cardiovasculares, su actividad *antioxidante*, protegiendo los tejidos del daño oxidativo y del envejecimiento celular, su acción *antiinflamatoria*, reduciendo la actividad de la enzima hialuronidasa, y sus propiedades *anticancerígenas*. Todo ello, hace que los polifenoles sean considerados como un subproducto de alto valor añadido [Mello, 2003].

De hecho, actualmente se están realizando numerosas investigaciones a nivel mundial con el fin de conocer la cantidad y el tipo de polifenoles presentes en los alimentos, ya que muchos de los efectos saludables de los mismos, se deben en realidad a su alto contenido en polifenol, tal es el caso de las fibras dietéticas.

Por otro lado, las propiedades organolépticas de ciertas frutas, y consecuentemente, la calidad de algunos alimentos y bebidas, dependen de la concentración y tipo de compuesto polifenólico presente [Freire, 2003]. Un ejemplo, lo encontramos en el aceite de oliva. Los polifenoles al tratarse de antioxidantes naturales, ralentizan o previenen los procesos de descomposición de aceites y grasas. De ahí que la determinación de estos compuestos sea importante a la hora de evaluar la calidad del aceite, ya que son parcialmente responsables de su estabilidad a la autooxidación y de sus características organolépticas [Capannesi, 2000].

### ***I.5.2 Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos***

La necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que se plantean hoy en día, requiere disponer de técnicas rápidas y fiables que permitan la detección “in situ” de sustancias contaminantes, como es el caso de los compuestos fenólicos presentes en muestras ambientales, y otras sustancias de interés, como los polifenoles en alimentos.

Este hecho ha impulsado el desarrollo de biosensores como alternativa a técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, que generalmente implican un mayor tiempo de análisis.

El empleo de enzimas, como elemento de reconocimiento biológico, y la detección amperométrica como sistema de transducción, para la fabricación de biosensores, proporciona numerosas ventajas desde un punto de vista analítico. En este apartado se va a dar una visión general de los diferentes métodos desarrollados en los últimos años basados en la utilización de biosensores enzimáticos amperométricos para la detección y determinación de compuestos fenólicos.

En la *Tabla 4* se resumen las características de diferentes biosensores electroquímicos encontrados en la bibliografía para la determinación de compuestos fenólicos. Los biosensores han sido agrupados atendiendo al material enzimático empleado, indicándose la enzima utilizada y la forma de inmovilización, el potencial de medida, sus parámetros experimentales, así como las características analíticas del método y el tipo de muestra a la que se han aplicado.

Como puede apreciarse, se han construido una amplia variedad de biosensores enzimáticos modificando electrodos de pasta de carbono y de carbono vitrificado. La mayoría de los métodos se basan en la reducción electroquímica de los productos de la reacción enzimática. Sin embargo, en algunos casos se utiliza una sustancia mediadora, cuya oxidación o reducción sobre el electrodo sirve para monitorizar la concentración de los fenoles en disolución.

También se han encontrado ejemplos en los que se emplea un electrodo de Clark [Campanella, 2006]. En estos casos, la monitorización de los compuestos fenólicos se lleva a cabo mediante la detección del consumo de oxígeno, lo que conlleva la desventaja de la necesidad de aplicar un potencial de medida bastante negativo, aumentando así el número de interferencias.

La inmovilización de las enzimas en los electrodos de oxígeno suele realizarse colocando la enzima sobre la superficie de la membrana permeable al gas del electrodo de oxígeno y recubriéndola con una membrana de diálisis o de otro tipo [Streffer, 2001], o bien inmovilizando previamente la enzima en un gel que posteriormente se deposita en la membrana del electrodo [Campanella, 2004].

A la hora de llevar a cabo la preparación de biosensores, hay que tener en cuenta que la inmovilización de la enzima en la superficie electródica depende del tipo de material electródico empleado. Así, en los biosensores que utilizan materiales compósitos, el método de inmovilización más utilizado es el atrapamiento del material proteico en la matriz electródica [Serra, 2002], aunque en ocasiones la enzima se inmoviliza después de haberse mezclado con otras partículas [Liu S., 2003a]. Otra alternativa es el empleo de una fina capa de sol-gel para la inmovilización de la enzima sobre la superficie del electrodo.

Una gran parte de los diseños que utilizan electrodos de carbono vitrificado llevan a cabo la inmovilización de la enzima por encapsulamiento con una membrana [Rajesh, 2004a], por atrapamiento en una matriz polimérica depositada en la superficie del electrodo [Védrine, 2003], mediante el empleo de un hidrogel [Wang B., 2000a], o por unión covalente con carbodiimida [Freire, 2002a]. En algunos casos, se emplean conjuntamente dos métodos de inmovilización, por ejemplo, unión covalente con glutaraldehído en la superficie del electrodo y posterior encapsulamiento con una membrana de diálisis, o unión covalente a un hidrogel que posteriormente se deposita sobre la superficie del electrodo [Freire, 2002b].

En el caso de emplear un electrodo de grafito sólido la inmovilización de la enzima es similar a la de los electrodos de carbono vitrificado, si bien es más frecuente la adsorción, debido a la ventaja de que este material posee una superficie rugosa [Haghighi, 2003; Jarros-Wilkolazka, 2004].

El medio de trabajo de estos biosensores es comúnmente acuoso o predominantemente acuoso, empleándose en la mayoría de los casos regulador fosfato a pHs entre 5.0 y 7.4. En algunos casos, se añade un cierto porcentaje de metanol, [Narváez, 1996], etanol [Gomes, 2004] o acetonitrilo [Rogers, 1999].

A pesar del gran número de sensores enzimáticos amperométricos existentes, muy pocos han sido aplicados a muestras reales. No obstante, se han desarrollado aplicaciones en aguas, suelos, filtros de cigarrillo, aceites, cervezas, vinos y pesticidas. La escasa aplicación de los biosensores desarrollados puede atribuirse a la dificultad de llevar a cabo medidas en matrices complejas, en las cuales el límite de detección puede aumentar considerablemente, la estabilidad de la enzima suele disminuir y la pasivación electrodo es habitualmente mucho más acusada.

**Tabla 4 .-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	TÉCNICA DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Pasta de Carbono	Atrapam. físico de Tir en la matriz compósita	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V)	Reg. fosfato 0.1 M pH 6.5	Bisfenol A/ Agua	Interv. lineal : 0.1-12 $\mu$ M Sensib.: 138 $\mu$ A $mM^{-1}$ LD: 0.02 $\mu$ M	[Mita, 2007]
Pasta de carbono	Incorp. de Tir en la matriz junto al grafito y monómero de polipirrol	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.2 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M pH 7.0 + NaClO <sub>4</sub> 0.1 M	Fenol, catecol y p-cresol/ Salmón	<i>Fenol</i> Interv. lineal : 0-7 $\mu$ M Sensib.: 24.02 A $M^{-1}cm^{-2}$ <i>Catecol</i> Interv. lineal : 0-10 $\mu$ M Sensib.: 18.6 A $M^{-1}cm^{-2}$ <i>p-Cresol</i> Interv. lineal : 0-12 $\mu$ M Sensib.: 5.57 A $M^{-1}cm^{-2}$	[Tingry, 2006]
Pasta de carbono	Inmov. de Tir junto con Ru en la matriz electródica	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 10 mM, pH 7.4 Reprod.: < 5%	Ác. gálico/ Vinos	Interv. Lineal: 1-60 mg L <sup>-1</sup> LD: 0.1 mg L <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 3-4 horas	[Jewell, 2001]
Pasta de carbono	Incorporación de Tir en la matriz electrónica con copolímero PS 086	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.2 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 50 mM, pH 6.5	Fenol, catecol	<i>Inter. lineal:</i> 0-100 $\mu$ M <i>Catecol</i> Sensib.: 0.093 A $M^{-1}$ <i>Fenol</i> Sensib.: 0.077 A $M^{-1}$	[Rogers, 2000]
Pasta carbono vitrificado	Inmov. de Tir por atrapamiento físico en la matriz electródica	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V)	Reg. fosfato 0.05 M, pH 7.4	Polifenoles / Vinos y te	<i>Catecol</i> Interv. lineal: <35 $\mu$ M Sensib.: 2.4x10 <sup>7</sup> nA $M^{-1}$ LD: 0.41 $\mu$ M <i>Fenol</i> Interv. lineal: <70 $\mu$ M Sensib.: 9x10 <sup>6</sup> nA $M^{-1}$ LD: 1.7 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 4 meses (90% de la respuesta inicial)	[Rodríguez, 2002]

**Tabla 4.-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Carbono vitrificado	Inmov. de Tir sobre superf. de bioreactor modif. con 3-aminopropilo, entrecruz. con GA.	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.15 V vs. Ag/AgCl)	Reprod.: < 4.0% (RSD) Reg. fosfato 0.1 M pH 7.0	Penicilina / Suero humano y fármacos	Interv. lineal : 0.02 – 80 $\mu$ M Sensib.: 3.8 $\mu$ A $mM^{-1} cm^{-2}$ LD: 7 nM	[Torriero, 2006]
Carbono vitrificado	Mezcla de Tir con polimeros de agarosa y guar e inmov. sobre superf. de GCE	DPV	<i>Dopamina</i> $K_{app}^m = 200 \mu$ M <i>4-Metil catecol</i> $K_{app}^m = 2.28 \times 10^{-3} M$ Fosfato 0.1 M pH 6.0	L-Dopa, DL Dopa, Dopamian, 4-metil catecol/ Suero	<i>Dopamina</i> Interv. lineal: 2-10 $\mu$ M LD.: 0.9 $\mu$ M <i>4-metilcatecol</i> Interv. lineal: 30-1200 $\mu$ M LD.: 17 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 2 meses	[Tembe, 2006]
Carbono vitrificado	Inmov. de Tir y chitosan sobre superf. GCE	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.15 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M pH: 6.52	DOPAC	Interv. Lineal: 6 nM-0.2 $mM$ Sensib.: 40 $\mu$ A $mM^{-1}$ LD: 3 nM Tiempo de vida útil: 3 días	[Liu A., 2005]
Carbono vitrificado	Inmov. en película de polipirrol modif. con p-toluensulfonato	Amperom. ( $E_{ap.}$ : +0.05 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.1 M Tiempo de resp.: 40-75 s	Fenol, catecol, p-cresol/ Medios acuosos	<i>Fenol</i> Interv. lineal: 3.3-220.3 $\mu$ M Sensib.: 17.1 $\mu$ A $mM^{-1}$ , LD: 0.8 $\mu$ M <i>Catecol</i> Interv. lineal: 5.6-74.3 $\mu$ M Sensib.: 70.2 $\mu$ A $mM^{-1}$ , LD: 1.5 $\mu$ M <i>p-clorofenol</i> Interv. lineal: 3.8-85.6 $\mu$ M Sensib.: 24.3 $\mu$ A $mM^{-1}$ , LD: 2.4 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 3 meses (almacenamiento 4°C)	[Rajesh, 2004a]
Carbono vitrificado	Polimerización de Tir y matriz de sol-gel sobre superf. del electrodo	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.02 M, pH 6.0 Tiempo de respuesta < 10 s	Fenol	Interv.. lineal: $7.5 \times 10^{-8}$ - $6 \times 10^{-6} M$ Sensib.: 15.78 $\mu$ A $\mu$ M-1 $cm^{-2}$ LD: $1 \times 10^{-8} M$ Tiempo de vida útil: 2 meses	[Zhang T., 2003]

**Tabla 4.-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Carbono vitrificado	Atrapamiento de Tir en matriz de sol-gel de titanio	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.15 V)	Reg. fosfato 0.02 M pH 7.0 Tiempo de respuesta: < 5s $K_{app}^m = (0.29 \pm 0.02) \text{mM}$	Fenol	Inter. lineal: $1.2 \times 10^{-7}$ - $2.6 \times 10^{-4}$ M Sensib.: $103 \mu\text{A mM}^{-1}$ LD: $0.1 \mu\text{M}$ Tiempo de vida útil: 80 días (94% de respuesta inicial, almacenado a 4° C)	[Yu, 2003]
Carbono vitrificado	Atrapamiento de Tir en película de sílice/Nf sobre superf. del electrodo	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M, pH 7.0 <i>Catecol</i> $K_{app}^m$ : 75 mM <i>Fenol</i> $K_{app}^m$ : 65 mM Tiempo de respuesta: 15 s	Catecol, fenol	<i>Catecol</i> Interv. lineal: 1-100 $\mu\text{M}$ Sensib.: $200 \text{mA M}^{-1}$ , LD.: 0.35 mM <i>Fenol</i> Interv. Lineal: 5-100 $\mu\text{M}$ Sensib.: $46 \text{mA M}^{-1}$ , LD: 1 $\mu\text{M}$ Tiempo de vida útil: 2 semanas (74% respuesta inicial, almacenamiento)	[Kim, 2003]
Carbono vitrificado	Atrapamiento de Tir en polímero conductor poli-3,4-etiledioxitiofenol	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M pH 6.5 Tiempo de respuesta: 20-40 s	Compuestos fenólicos y herbicidas	<i>Catecol</i> Interv. lineal: < 25 $\mu\text{M}$ Sensib.: $1999 \text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ <i>Fenol</i> Interv. lineal: < 25 $\mu\text{M}$ Sensib.: $608 \text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ , LD.: 50 nM	[Védrine, 2003]
Carbono vitrificado	Coinmov. de Tir y tionina (mediador) sobre superf. modif. con poli-dicarbazol	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M pH 7	Catecol	Interv. Lineal: < 10 $\text{mM}^{-2}$ Sensib.: $14.57 \text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ Tiempo de vida útil: 5 días	[Cosnier, 2001]
Screen printed	Inmov. de Tir sobre superf. y entrecruz. con GA y BSA	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V)	Inhibición competitiva Reg. fosfato 50 mM pH 6.5	Pesticidas / Agua de río	Interv. lineal: Metilparatión: 6-100 ppb Diazinona: 19-50 ppb Carbofuran: 5-90 ppb Carbaril: 10-50 ppb Tiempo de vida útil: 15 días <sub>-1</sub>	[Albuquerque, 2007]
Screen Printed	Inmov. de Tir sobre superf. modif. con GA	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.4 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato pH 7.0	BSA,HSA/ Suero humano	<i>BSA</i> Interv. lineal: 0.2-0.5 $\text{mg mL}^{-1}$ Sensib.: $2523.1 \text{nA mL mg}^{-1}$ <i>HSA</i> Interv. lineal: 0.1-0.4 $\text{mg mL}^{-1}$ Sensib.: $1995.3 \text{nA mL mg}^{-1}$ Tiempo de vida útil: 5 días	[Chuang, 2006]

Tabla 4.- Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Screen-Printed	Inmov. de Tir con BSA y ref. fosfato sobre superf. y entrecruzam. con GA	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.1 V vs. Ag/AgCl)	<i>p-aminofenol</i> $K_{app}^m = 80 \mu M$ <i>p-cresol</i> $K_{app}^m = 71 \mu M$ <i>Fenol</i> $K_{app}^m = 121 \mu M$ <i>p-clorofenol</i> : $K_{app}^m = 89 \mu M$ <i>Catecol</i> $K_{app}^m = 284 \mu M$	<i>p-aminofenol</i> , <i>p-cresol</i> , <i>fenol</i> , <i>p-clorofenol</i> , <i>catecol</i> / Aguas residuales	<i>p-aminofenol</i> Sensib.: $1.3 \text{ mA M}^{-1}$ LD: $2.4 \mu M$ <i>p-cresol</i> Sensib.: $9.3 \text{ mA M}^{-1}$ LD: $0.33 \mu M$ <i>Fenol</i> Sensib.: $9.7 \text{ mA M}^{-1}$ LD: $0.41 \mu M$ <i>p-clorofenol</i> : Sensib.: $16 \text{ mA M}^{-1}$ LD: $0.19 \mu M$ <i>Catecol</i> Sensib.: $6.9 \text{ mA M}^{-1}$ LD: $0.43 \mu M$	[Solná, 2005b]
Screen-Printed: Au [1] Grafito+Au [2] Carbopack CAu[3]	Inmov. de Tir por entrecruzam. con polímero PV13-dmeOs sobre dif. superficies	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.05 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.02 M pH 7.0 + KCl 0.1 M	Catecol	[1] Interv. lineal: $0.5-30 \mu M$ LD: $0.18 \mu M$ [2] Interv. lineal: $0.5-30 \mu M$ LD: $0.14 \mu M$ [3] Interv. lineal: $0.5-30 \mu M$ LD: $0.16 \mu M$ Tiempo de via útil: 6 meses	[Sapelnikova, 2003]
Screen-Printed	Inmov. Tir+copolímero PCS sobre superf. de HRP-SPCE	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.05 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 50 mM, pH 7.0 Tiempo de respuesta: 2.4 min	Fenoles/ Aguas	<i>Fenol</i> Interv. lineal: $0.025-45 \mu M$ Sensib.: $1.99 \mu A \mu M^{-1} \text{ cm}^{-2}$ LD: 25 nM <i>Catecol</i> Interv. Lineal: $0.120-43 \mu M$ Sensib.; $1.85 \mu A \mu M^{-1} \text{ cm}^{-2}$ LD: 5 nM Tiempo de vida útil: 60 días	[Chang, 2002]
Screen-Printed	Atrapamiento de Tir en matriz polimérica sobre screen-printed de grafito	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.2 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M, pH 7.0	Catecol/ Cerveza	Interv. Lineal: $0.025-14 \mu M$ Sensib.: $5740 \text{ mA mol cm}^{-2}$	[Cumming, 2001a]
Screen-Printed	Atrapamiento de Tir en pirrol sobre la superf. del electrodo	Amperom. ( $E_{ap.}$ : -0.20V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.1 M, pH 7.0	Catecol, flavonoides/ Cerveza	<i>Catecol</i> Interv. lineal: $0.5- 20 \mu M$ Sensib.: $409 \text{ mA M}^{-1}$	[Cumming, 2001b]

**Tabla 4.-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Screen Printed (Carbopack ó Pt)	Inmov. de Tir, con PEGDGE y PV13-dmeOs sobre superf.	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.05 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 50 mM pH 7 + KCl 0.1 M	Fenol, catecol/ Aguas residuales	<i>Carbopack</i> Catecol (En discontinuo) LD: 0.35 $\mu$ M (En FIA): LD: 1.7 $\mu$ A Fenol (En discontinuo) LD: 1.5 $\mu$ M <i>Pt</i> Catecol LD: 0.38 $\mu$ M Fenol LD: 1.6 $\mu$ M	[Solná, 2005a]
Grafito-Teflón	Atrapam. de enzima en la matriz compósita	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V vs. Ag/AgCl)	Reprod. (n=10): 9.7 % Repetib. (n=10): 4.0 % Micelas inversas formadas con etilacetato + 5% de reg. fosfato pH 7.4	PG/ Manteca	Interv. lineal: 8-200 $\mu$ M Sensib.: $2.10 \times 10^3 \mu$ AM <sup>-1</sup> LD: 1.3 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 70 días	[Morales, 2005a]
Grafito-Teflón	Atrapam. de enzima en la matriz compósita	<i>En Reg. fosfato</i> Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V) <i>En ACN-Tris</i> Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.2 V)	En Reg. fosfato 0.05 M pH 6.5 $K_{app}^m = 50 \mu$ M <i>En Acetonitrilo-Tris</i> $K_{app}^m = 0.28 \times 10^3$ M	PG/ aceite de oliva	<i>En fosfato</i> Interv. lineal: 2-100 $\mu$ M Sensib.: 15.2 $\mu$ A M <sup>-1</sup> LD: 0.9 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 40 días <i>En ACN-Tris</i> Interv. lineal: 8-200 $\mu$ M Sensib.: 6.5 $\mu$ A M <sup>-1</sup> LD: 1.1 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 50 días	[Morales, 2005b]
Grafito Teflón	Atrapam. físico en la matriz electródica	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M, pH 6.5	Fenol, catecol, 2.clorofenol, 4-clorofenol, 4-Cl-2MPh/ Aguas residuales de refinaria	<i>Interv. Lineal:</i> $1.0 \times 10^{-8}$ - $4.0 \times 10^{-5}$ M <i>Sensib.:</i> $8.5 \times 10^4 \mu$ A M <sup>-1</sup> <i>LD:</i> $1.0 \times 10^{-8}$ M	[Serra, 2003]
Grafito-Teflón	Atrapamiento físico de Tir en matriz electródica	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V Vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M, pH 6.5	Fenoles	<i>Fenol</i> Interv. Lineal: 0.1-25 $\mu$ M Sensib.: 0.28 A M <sup>-1</sup> , LD: 0.1 $\mu$ M <i>Catecol</i> Interv. Lineal: 0.1-15 $\mu$ M Sensib.: 0.30 A M <sup>-1</sup> , LD: 0.1 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 30 días	[Serra, 2002]

Tabla 4.- Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Grafito- EPD	Atrapamiento físico de Tir en la matriz electródica	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M, pH 6.5	Fenoles	<i>Fenol</i> Interv. Lineal: 0.05-6 $\mu$ M Sensib.: 0.62 A M <sup>-1</sup> , LD: 0.026 $\mu$ M <i>Catecol</i> Interv. lineal: 0.05- 8 $\mu$ M Sensib.: 0.66 A M <sup>-1</sup> , LD: 0.028 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 5 días	[Serra, 2002]
Diamante	Inmov. covalente de Tir sobre superf. modif. con B y con película de 4-nitrobencenodiazonio tetrafluorborato ó aminofenilo	CV y Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.15 vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M ,pH 6.5	Fenol p-cresol 4-clorofenol	<i>Fenol</i> Interv. lineal: 1-200 $\mu$ M Sensib.: 232.5 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD:0.2 $\mu$ M <i>p-cresol</i> Interv. lineal: 1-200 $\mu$ M Sensib.: 636.7 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 0.1 $\mu$ M <i>4-Clorofenol</i> Interv.lineal:1-250 $\mu$ M Sensib.: 385.8 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> LD: 0.1 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 5 semanas	[Zhou, 2006]
Platino	Dep. de Tir ,GDH y HRP homogeneizadas en agar-agar sobre superf. de Pt modif.con membrana de diálisis	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.05 V vs. SCE)	Reg. fosfato 0.1 M + LiClO <sub>4</sub> 0.1 M <i>Tyr</i> : $K_{app}^m = 10$ mM <i>Tyr+HRP</i> : $K_{app}^m = 55$ mM <i>Tyr+GOx</i> $K_{app}^m = 14$ mM Tiempo de respuesta: 1 ó 2 min.	Fenol, 1,2 DHB, 1,3-DHB, 1,4-DHB, 4 clorofenol	L-Tirosina <i>Tyr</i> Sensib.: 0.01 mA M <sup>-1</sup> <i>Tyr + HRP</i> Sensib.:0.326 mA M <sup>-1</sup> <i>Tir-GOx</i> Sensib.: 0.741 mA M <sup>-1</sup> Tiempo de vida útil: 3 meses	[Stanca, 2003]
Electrodo de oxígeno Clark (Oro)	Atrapam. de Tir y SH en membrana de TAC. Dep. sobre membrana de dialisis e inmov. sobre superf. de Au	Amperom.	Rep.: < 7% (RSD) Reg. fosfato 0.06 M pH 6.6	Fenol y ác. salicílico/ Orina	<i>Fenol</i> Interv. lineal : 2x10 <sup>-6</sup> - 1.5x10 <sup>-4</sup> M <i>Ác. Salic.</i> : Interv. lineal : 4x10 <sup>-6</sup> - 1x10 <sup>-4</sup> M LD: 0.5 $\mu$ M Tiempo de vida: 5 días	[Campanella, 2006]

**Tabla 4.-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/ MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Electrodo Clark	Inmov. de Tir junto con BSA y GA sobre membrana pre-activada y dep. sobre superf. del electrodo	Amperom.	Medio n-Hexano Medidas en discontinuo y FIA	Oleuropenia, fenol y catecol/ Aceite oliva	<i>Fenol</i> (En discontinuo) Interv. lineal: 0.5-6 ppm Sensib.: 0.2 ppm/ A.U. %, LD: 0.04 ppm (En FIA) Interv. lineal:10-500 ppm, LD: 4 ppm <i>Catecol</i> (En discontinuo) Interv. lineal:0.5-5 ppm Sensib.: 0.1 ppm/ A.U. %	[Capannesi, 2000]
Electrodo Clark	Inmov. de Tir junto con BSA y GA sobre membrana pre-activada y dep. sobre superf. del electrodo	Amperom.	Medio n-Hexano Medidas en discontinuo y FIA	Oleuropenia, fenol y catecol/ Aceite oliva	<i>Fenol</i> (En discontinuo) Interv. lineal: 0.5-6 ppm Sensib.: 0.2 ppm/ A.U. %, LD: 0.04 ppm (En FIA) Interv. lineal:10-500 ppm, LD: 4 ppm <i>Catecol</i> (En discontinuo) Interv. lineal:0.5-5 ppm Sensib.: 0.1 ppm/ A.U. %	[Capannesi, 2000]
Carbono vitreo reticulado	Inmov. covalente de Tir con 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meta-p-toluensulfonato	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.2 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M pH 6.5 Tiempo de respuesta < 10 s	Fenol, 2,4-dimetilfenol, 3-Clorofenol, 4-Clorofenol, 4-Cloro-3-metilfenol, 2-aminofenol	<i>Fenol</i> Interv.. lineal: 0.5-30 $\mu$ M Sensib.: 8.2 nA $\mu$ M <sup>-1</sup> , LD: 0.26 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 20 días	[Peña, 2001]
Oro	Inmov. de Tir sobre superf. modif. con MPA y entrecruzam. con GA	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.1 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato 0.05 M pH 7.0	Fenol, 3,4-dimetilfenol, 2,4- dimetilfenol/ Aguas residuales de refinерías	<i>Fenol</i> Interv. lineal: 0.2-200 $\mu$ M Sensib.: 1.39x10 <sup>-2</sup> A M <sup>-1</sup> , LD: 0.88 nM <i>3,4-DMP</i> Inter. lineal:0.44-20 $\mu$ M Sensib.: 4.5 x10 <sup>-2</sup> A M <sup>-1</sup> , LD: 0.18 $\mu$ M <i>2,4-DMP</i> Interv. lineal: 1-1000 $\mu$ M Sensib: 7.31x10 <sup>-4</sup> A M <sup>-1</sup> , LD: 0.65 $\mu$ M Tiempo de vida útil: 5 días	[Campuzano, 2003]

**Tabla 4.-** Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

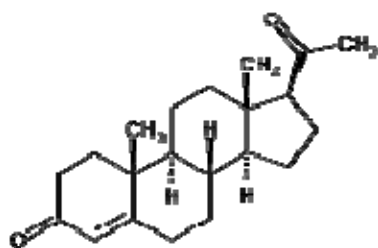
ELECTRODO	TÉCNICA INMOVILIZACIÓN	DETECCIÓN	PARÁMETROS EXPERIMENTALES	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
ITO	Inmov. covalente de Tir sobre PAPCP	Amperom. ( $E_{ap}$ : -0.2 V vs. Ag/AgCl)	Reg. fosfato pH 7.2	Fenol, catecol, p-cresol	<i>Fenol</i> Interv. Lineal: 1.35-222.3 $\mu$ M <i>Catecol</i> Interv. Lineal: 5.6-74.3 $\mu$ M <i>p-cresol</i> : Interv. Lineal: 3.8-85.6 $\mu$ M Tiempo de vida: 4 meses (80% de la actividad enzimática)	[Rajesh, 2004 <sup>b</sup> ]

*Abreviaturas:* ACN: acetonitrilo, B: boro, DOPAC: 3,4-dihidroxifenilacetico, DHB: dihidroxibenceno, DMP: dimetilfenol, EPD: etilenpropilendieno, GA: glutaraldehído, GDH: glucosa deshidrogenasa, MPA: ácido mercaptopropionico, PAPCP: poly (*N*-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole), PCS: poli(carbamoylsulfonato), PEGDGE: poli(etilenglicol) diglicidil éter, PVI13-dmeOs: {poly[(1-vinylimidazol)osmio (1,4-dimethylbipiridina)2Cl]}<sub>2</sub>, Ph: fenol, PS 086: copolimero de polimetilsiloxano (85%) y difenilsiloxano (15%), Ru: rutenio, SH: salicilato hidroxilasa, SPCE: electrodo de carbono serigrafado, TAC: triacetate de celulosa, Tir: tirosinasa

### I.5.3. Progesterona

La progesterona es una hormona esteroidea que se encuentra en diferentes tejidos y fluidos biológicos. Esta hormona es producida principalmente en el cuerpo lúteo de los ovarios, en el período posterior a la ovulación, aunque también puede ser sintetizada en las glándulas adrenales y el hígado.

La progesterona presenta una estructura (*Figura 2*) derivada del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, también llamado esterano. Este compuesto es un hidrocarburo policíclico que se puede considerar un producto de la saturación del fenantreno asociado a un anillo de ciclopentano. Posee 17 átomos de carbono. De esta base estructural derivan los esteroides, que son la molécula base para multitud de moléculas de origen lipídico, como los esteroides (colesterol), ácidos biliares y hormonas esteroideas.



*Figura 2.-Estructura de la Progesterona*

Su determinación se lleva a cabo principalmente en suero, sangre o en leche.

En el ganado vacuno, para el que se utilizan técnicas de inseminación artificial, la monitorización de los niveles de progesterona en leche constituye el método más eficaz para predecir los períodos de ovulación y de gestación [Velasco-García, 2001]. Su determinación en leche, implica el trabajar con una matriz compleja, debido principalmente a la presencia de proteínas y grasas.

#### *1.5.4. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de progesterona empleando inmunosensores electroquímicos*

Es sobradamente conocido el interés que presenta la determinación de progesterona en ganado, para predecir los periodos de ovulación y, así determinar los periodos de fertilidad y llevar a cabo la inseminación en el momento adecuado. De ahí la necesidad de dispositivos sencillos y de fácil manejo que proporcionen resultados rápidos y fiables.

A pesar de que los inmunosensores constituyen una poderosa herramienta que puede ser empleada para fines de diagnóstico clínico, control de la presencia de contaminantes, y monitorización de una gran variedad de compuestos biológicos, son aún escasas las configuraciones encontradas en la bibliografía para la determinación de esta hormona.

La mayor parte de los inmunosensores se basan en la inmovilización del anticuerpo de la progesterona sobre la superficie electródica y, posteriormente la realización de un inmunoensayo de tipo competitivo entre la progesterona de la muestra, normalmente leche, y la progesterona marcada con fosfatasa alcalina. Así, Xu y colaboradores prepararon un inmunosensor basado en el empleo de un electrodo de carbono serigrafiado ("screen-printed") modificado con un recubrimiento de inmunoglobulina G, sobre el cual se inmoviliza la anti- Progesterona. Tras realizar el inmunoensayo competitivo se adiciona *p*-nitrofenilfosfato como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina, llevándose a cabo la detección amperométrica del *p*-nitrofenol producido en la reacción enzimática [Xu Y.F., 2005].

Pemberton y colaboradores desarrollaron un inmunosensor similar al anterior, empleando dos sustratos diferentes, 4-aminofenilfosfato y 1-

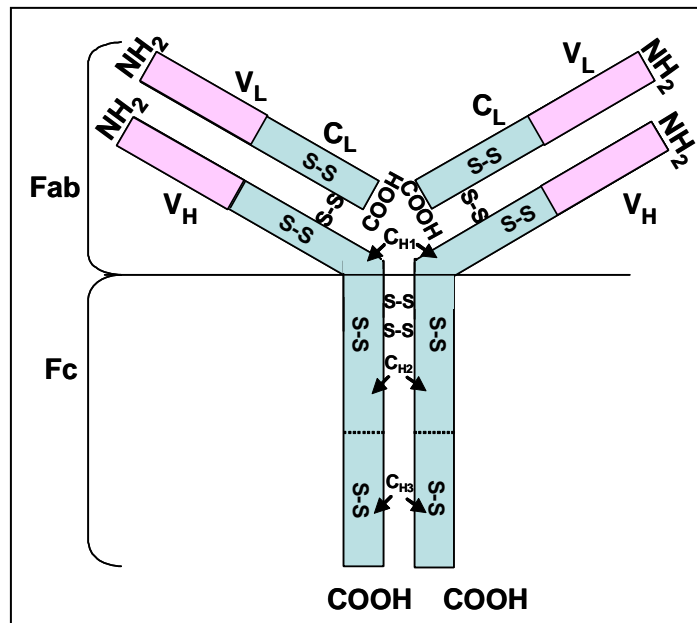
naftilfosfato, de la enzima fosfatasa alcalina. Es de destacar que, en ambos casos, las curvas de calibrado muestran una curvatura o meseta a bajas concentraciones de progesterona, impidiendo la determinación de la hormona a niveles de concentración inferiores a 5 ng/mL [Pemberton, 1998 y 1999]. Posteriormente este grupo de trabajo preparó un inmunosensor que opera en un sistema de flujo. El mayor inconveniente de este sistema es la elevada corriente de fondo que se obtiene debido a la concentración elevada de sustrato que hay que introducir en el sistema de flujo [Pemberton 2001].

Velasco y colaboradores desarrollaron un sistema automatizado para predecir la ovulación del ganado. Este dispositivo incluye un inmunosensor para la determinación de progesterona, así como un sistema de muestreo automático y un sistema de recogida y comparación de datos. De esta forma puede monitorizarse diariamente la concentración de progesterona en leche fresca en el intervalo de concentraciones comprendido entre 3 y 20 ng/mL, lo que permite un control del ciclo de ovulación y determinar el momento de la preñez [Velasco, 2001].

Otro ejemplo de inmunosensor, basado en un inmunoensayo competitivo indirecto es el desarrollado por Kreuzer y col. En este caso, sobre la superficie electródica se deposita 5  $\mu\text{L}$  de Progesterona conjugada con BSA, seguidamente se trata con anti-Progesterona y finalmente con inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina. El producto obtenido de la reacción enzimática empleando *p*-aminofenilfosfato como sustrato, da lugar a una respuesta en voltamperometría diferencial de impulsos que es proporcional a la concentración del analito, obteniéndose un intervalo lineal de 16 a 256 ng mL<sup>-1</sup> y un límite de detección para progesterona de 3 ng mL<sup>-1</sup> [Kreuzer, 2004].

### I.5.5. Inmunoglobulinas

El conjunto de glucoproteínas del suero elaboradas por las células plasmáticas en respuesta a una estimulación antigénica, constituyen las denominadas inmunoglobulinas. Todas las inmunoglobulinas poseen una estructura básica similar formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas denominadas cadenas pesadas (cadenas H, heavy) y dos cadenas ligeras (cadenas L, light). Las cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro adoptando la forma de Y que se muestra en la *Figura 3*.



*Figura 3.- Estructura básica de una inmunoglobulina*

Cada cadena polipeptídica está compuesta por dominios o secuencias peptídicas de tamaño uniforme, unidos entre sí por puentes disulfuro dentro de la propia cadena. En la estructura de la inmunoglobulina pueden diferenciarse dos regiones. La región variable (V), siendo éste el dominio N-terminal o sitio de combinación del anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos es más variada que el resto de la cadena polipeptídica, y las llamadas regiones constantes (C),

compuestas por dominios similares en todas las inmunoglobulinas de la misma especie. Las cadenas ligeras están compuestas por una región variable y una región constante ( $V_L$  y  $C_L$ ). Sin embargo, las cadenas pesadas constan de una región variable y tres o cuatro regiones constantes ( $V_H$  y  $C_{H1-H4}$ ). Dependiendo de las regiones constantes encontradas en las cadenas pesadas y ligeras podemos clasificar los anticuerpos en diferentes clases y subclases. En el ser humano hay dos tipos de cadenas L y cinco de cadenas H que dan lugar a las diferentes inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

En suero humano normal la inmunoglobulina G es la inmunoglobulina mayoritaria y constituye aproximadamente un 74% del total. Tiene un peso molecular aproximado de  $1.5 \times 10^5$  Da y es la única clase de inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta. Por este motivo, los valores de inmunoglobulina G (IgG) son muy importantes sobretodo en neonatos, ya que contienen la inmunoglobulina G transferida por la madre a través de la placenta. Cabe destacar, que durante los 3 últimos meses del embarazo la IgG transferida al feto aumenta y sus niveles vuelven a disminuir durante los tres primeros meses de vida.

Por otro lado, cuando se lleva a cabo la ingesta de un alimento alérgico para un individuo, puede ocurrir que la reacción alérgica se manifieste de forma inmediata, cuya reacción específica vendría dada por la participación de la inmunoglobulina E, ocasionando respuestas tales como, erupciones, catarro o hinchazón, o que aparezca pasado un tiempo de la ingesta de dicho alimento, en este caso, la reacción estaría mediada por la inmunoglobulina G, y los síntomas son trastornos de sueño, infecciones e irritabilidad. La única manera de detectar alergias mediadas por IgG es a través de pruebas sanguíneas,

conociéndose la presencia y la fase en la que se encuentra una determinada infección.

### ***I.5.6. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de inmunoglobulinas empleando inmunosensores electroquímicos***

La preparación de inmunosensores electroquímicos, y su aplicación a la determinación de inmunoglobulinas se han resumido en la *Tabla 5* donde se muestran las diferentes estrategias encontradas en la bibliografía.

El empleo de electrodos serigrafados (“screen-printed”) es frecuente en la preparación de inmunosensores. Así, Darain y col. han diseñado un inmunosensor amperométrico basado en este tipo de superficies electródicas para la determinación de inmunoglobulina G de conejo, alcanzándose un límite de detección de  $330 \text{ ng mL}^{-1}$ . Del mismo modo, Díaz González y col. diseñaron otro inmunosensor para la determinación de esta misma inmunoglobulina obteniendo un menor límite de detección, siendo en este caso de  $7 \text{ ng mL}^{-1}$ , empleando para su detección voltamperometría de onda cuadrada.

Wilson y col., utilizaron una matriz de iridio para la construcción de un inmunosensor amperométrico con el fin de determinar inmunoglobulina G humana, basado en un inmunoensayo tipo sándwich [Wilson, 2004]. Por otro lado, Wang Z. y col. emplearon un electrodo de carbono vitrificado modificado con un compuesto de ZnO/Chitosan, consiguiendo disminuir el límite de detección hasta  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  [Wang, 2006].

Actualmente, el empleo de nanomateriales, tales como nanotubos de carbono y nanopartículas metálicas, supone una importante herramienta para la

preparación de inmunosensores, consiguiéndose importantes mejoras en cuanto a sus características analíticas.

Así, Sánchez y col. llevaron a cabo la modificación de una superficie serigrafiada con una mezcla de nanotubos de carbono y polisulfona (pSf), incorporando posteriormente inmunoglobulina G. Una vez preparado el inmunosensor amperométrico, llevaron a cabo un ensayo competitivo, con el fin de determinar inmunoglobulina G humana. Este mismo inmunosensor fue preparado de un modo similar pero modificando la superficie electródica con una mezcla de grafito y polisulfona, obteniéndose una sensibilidad inferior y peores características analíticas [Sánchez, 2007]. Otro inmunosensor en el que se ha aprovechado las ventajas del empleo de nanotubos de carbono, es el desarrollado por Yun y col. para la determinación de inmunoglobulina G de ratón mediante espectroscopia de impedancia faradaica (EIS) [Yun, 2007].

En cuanto al empleo de nanopartículas de oro, cabe destacar el diseño de Fu y col. basado en la modificación de un electrodo de oro con una monocapa de mercaptoetilamina modificada con nanopartículas de oro. La detección se basa en la medida potenciométrica en presencia de diferentes concentraciones del correspondiente antígeno [Fu, 2005]. Chen H. y colaboradores emplearon un novedoso procedimiento para amplificar la señal impedimétrica obtenida para diferentes concentraciones del analito, inmunoglobulina G humana, que implica el empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas cada una con varias moléculas de un anticuerpo determinado. Así, tras la inmovilización del anticuerpo (Ab primario) sobre la superficie de un electrodo de pasta de carbono y la unión del correspondiente antígeno (hIgG), se incubó en primer lugar en una disolución de oro coloidal marcado con el anticuerpo primario y en segundo lugar en otra disolución de oro coloidal marcada con un anticuerpo

secundario que se enlaza al anterior. El papel del oro coloidal es aumentar la cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre la superficie electródica, lo que da lugar a un mayor valor de la resistencia a la transferencia de carga a medida que aumenta la concentración del analito [Chen H., 2006].

Otra estrategia seguida para la determinación de inmunoglobulina G fue la desarrollada por Chen Z y col., en este caso se inmoviliza el analito sobre un electrodo de pasta de carbono, y posteriormente se incuba en una disolución de anticuerpo marcado con oro coloidal. Tras aplicar al dispositivo un potencial de oxidación de +1.3 V se mide la respuesta voltamperométrica de reducción [Chen Z, 2007].

Es posible emplear nanopartículas magnéticas ( $\text{CdFe}_2\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ) modificadas con 3-aminopropiltriétoxilano (APTS), proporcionando grupos amino en su superficie, para modificar la superficie electródica. La inmovilización del anticuerpo, anti-IgG sobre dicha superficie se realiza por entrecruzamiento con glutaraldehído. Este diseño se basa en un ensayo tipo sándwich, y la posterior detección amperométrica de la inmunoglobulina G humana [Liu, 2006].

**Tabla 5.-** *Inmunosensores electroquímicos aplicados a la determinación de Inmunoglobulinas*

MATERIAL ELECTRÓDICO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	TÉCNICA	ENSAYO/MEDIO	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Screen-Printed de grafito	Inmov. de anti-IgG sobre un pocillo, incub. en IgG, y unión del conjugado anti-goat-IgG marcado con Au col.	ASV	Sándwich/ Ab secundario marcado con nAu. Oxidación electroq. del oro con HBr/Br <sub>2</sub> Reg. fosfato, pH 7.4	IgG de cabra	Rango concen.: 0.5-100 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3 pM	[Dequaire, 2000]
Screen-Printed	Inmov. de Ab sobre Prot A ó G	LSV	a) Inmov. de rIgG sobre superf. modif. con Prot. A, b) unión de goat-anti-rIgG biotinilado c) posterior unión de GOx marcado con avidina-	IgG ratón e IgG conejo	LD (mIgG <sub>2a</sub> ): 0.02 µg mL <sup>-1</sup> LD ( rIgG): 0.2 µg mL <sup>-1</sup>	[Valat, 2000]
Screen-Printed	Unión cov. de HRP y estreptavidina sobre TCAP, inmov. de anti-IgG	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.35 V vs. Ag/AgCl)	Competitivo/ IgG-Gox, detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	IgG conejo (analito modelo)	Rango concen.: 500-2000 ngmL <sup>-1</sup> LD: 330 ng mL <sup>-1</sup>	[Darain, 2003]
Screen-Printed	Adsorc. de estreptavidina sobre SPCE pre-oxidado, e inmov. de anti-IgG biotinilado	CV, SWV	Competitivo, IgG-AP ; 3-indoxil-fosfato como sustrato de AP	IgG de conejo	Rango concen.: 4-140 ng mL <sup>-1</sup> LD: 7 ng mL <sup>-1</sup>	[Díaz-González, 2005]
Screen-Printed	Incorp. de IgG a una momembrana composita de CNTs-pSf	Amperom. (E <sub>ap</sub> : -0.1 V)	Competitivo/ Hidroquinona como mediador	IgG humana	Rango concen.: 2 a 5 µg mL <sup>-1</sup> LD: 1.66 µg mL <sup>-1</sup>	[Sánchez, 2007]

Tabla 5.- Inmunosensores electroquímicos aplicados a la determinación de Inmunoglobulinas

MATERIAL ELECTRÓDICO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	TÉCNICA	ENSAYO/MEDIO	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Pasta de Carbono	Inmov. de hIgG sobre PC y bloqueo superf. con BSA.	AC Voltamp.	Directo	IgG humana	Rango concn.: $10^{-10}$ - $10^{-8}$ M LD: $12.5 \mu\text{g L}^{-1}$	[Fernández-Sánchez, 2000]
Pasta de Carbono	Inmov. anti-IgG por entrecruzam. con GA sobre APTES-partículas de $\text{CdFe}_2\text{O}_4\text{-SiO}_2$ sobre CPE	Amperom. ( $E_{\text{ap}} = -0.3 \text{ V}$ )	Sándwich, anti-hIgG-HRP, detección $\text{H}_2\text{O}_2$ ; usando hidroquinona como mediador	IgG humana	Rango concn.: $510\text{-}30170 \text{ ng mL}^{-1}$ (i vs. Log C) LD: $180 \text{ ng mL}^{-1}$	[Liu Z.M., 2006]
Pasta de Carbono	Adsorc. de anti-hIgG sobre superf. de CPE oxidada e incub. en BSA. Au col. como marcador	ASV	Sándwich/ a) Incub. en hIgG, b) Incub. en anti-hIgG-Au col y oxid. a + 1.3 V Reg. fosfato 0.05 M pH 7.4	hIgG/ Suero humano	Rango concn.: $10\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$ LD: $4.0 \text{ ng mL}^{-1}$	[Chen Z., 2007]
Grafito-epoxi	Inmov de IgG. sobre Prot A incorporada en la matriz de grafito-epoxi	Amperom. ( $E_{\text{ap}} = -0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ )	Competitivo/ a) Inmov. rIgG, b) inmunoensayo competitivo anti-rIgG y anti-rIgG-biotina c) Estreptavidina-HRP; $\text{H}_2\text{O}_2$ como sustrato, Hidroquinona como mediador	anti-IgG	-	[Zacco E., 2004]
Grafito-epoxi	Modif. de superficie con membrana de pSf/DMF e inmov. de rIgG	Amperom. ( $E_{\text{ap}} = -0.1 \text{ V vs SCE}$ )	Competitivo/ Reg. Fosfato pH 7.0	anti-rIgG (analito modelo)	Rango concn.: $1\text{-}6 \mu\text{g mL}^{-1}$ LD: $0.77 \mu\text{g mL}^{-1}$	[Sánchez-Ordoñez 2007]
Nanotubos de carbono (CNT)	Activación de CNT e inmov. cov. de anti-IgG con EDC/NHS	CV y EIS	Directo	IgG ratón	Rango concn.: $< 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ LD: $200 \text{ ng mL}^{-1}$	[Yun, 2007]

Tabla 5.- Inmunosensores electroquímicos aplicados a la determinación de Inmunoglobulinas

MATERIAL ELECTRÓDICO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	TÉCNICA	ENSAYO/MEDIO	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Óxido de iridio	Inmov. de Ab en la matriz del óxido	Amperom. ( $E_{ap} = +0.420$ V)	No competitivo	IgG	Rango conc.(IgG):10-200 ng mL <sup>-1</sup> LD (IgG): 8 ng mL <sup>-1</sup>	[Wilson, 2004]
Carbono vitrificado	Atrapam. de Ab en membrana de polipirrol sobre GCE	PED	-	IgG conejo/ Suero	Rango concen.:50-200 µg mL <sup>-1</sup>	[Gooding 2004]
Carbono vitrificado	Incub. de anti-IgG sobre sup. mod. con película de Au electrodep. e incub en BSA	EIS	Sándwich / $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ 10 mM en KCl 0.1 M	IgG	Rango concen.: 0.011-11 ng mL <sup>-1</sup> LD: 0.009 ng mL <sup>-1</sup>	[Chen Z., 2005]
Carbono vitrificado	-	Amperom. ( $E_{ap} = -0.15$ V)	-	IgG humano/ Suero	Rango concen.:0-100 U mL <sup>-1</sup> LD: 0.6 U mL <sup>-1</sup> Sensibilidad: 0.033 µA/ U mL	[Messina, 2005]
Carbono vitrificado	Inmov. de anti-hIgG sobre GCE modif. con ZnO/chitosan	Amperom. ( $E_{ap} = -0.15$ V vs SCE)	Sándwich/ Hidroquinona como mediador	IgG humana	Rango concen.:2.5-500 ng mL <sup>-1</sup> LD: 1.2 ng L <sup>-1</sup>	[Wang Z, 2006]
Carbono vitrificado	Inmoviliz. de IgM por adsorción	ASV	No competitivo y competitivo	IgM humana	Rango concen.:7.5x10 <sup>-11</sup> -1x10 <sup>-9</sup> M LD: 2.8x10 <sup>-11</sup> M	[Escosura-Muñiz A., 2006]
Oro	Inmov. anti-IgG sobre superf. mod. con AET y nAu	Potenciom.	Sándwich/Medidas del cambio de potencial en presencia de IgG	IgG/ Suero	Rango concen.:12-800 ng mL <sup>-1</sup> LD: 3.4 ng mL <sup>-1</sup>	[Fu Y., 2005]
Oro	Inmov. de anti-hIgG sobre superf. de Au modif. con Au col. y HDT Bloqueo de superf. con BSA	EIS Amplific. señal por deposic. secuenc. de IgG y antiIgG-Au	Sándwich/ a) Inmov. hIgG, b) gota anti-hIgG-Au col. 20mM PBS + 0.1M KCl, 5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] /K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], pH 7.4	IgG humana	Rango concen.:15.3-328.3 ng L <sup>-1</sup> LD: 4.1 ng L <sup>-1</sup>	[Chen H, 2006]
Plata	Inmov. de IgG sobre superf. de Ag modif. con ODT	EIS	-	IgG conejo	Rango concen.:200-1000 ng mL <sup>-1</sup> LD: 200 ng mL <sup>-1</sup>	[Hou, 2004]

**Tabla 5.- Inmunosensores electroquímicos aplicados a la determinación de Inmunoglobulinas**

MATERIAL ELECTRÓDICO	MODIFICACIÓN ELECTRÓDICA	TÉCNICA	ENSAYO/MEDIO	ANALITO/MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	REF.
Platino	Inmov. del Ab sobre superf. mod. con DTSP, poli(amido-amina) dendrimero y nAu ó nanopartículas de sílica ó SiO <sub>2</sub> /nAu	CV	Reg. fosfato 10 mM pH 7.0	IgG / Suero humano	Rango concen.: 5.0-9600 µg mL <sup>-1</sup> LD: 0.8 ng mL <sup>-1</sup>	[Tang 2005d]

*Abreviaturas:* AET: mercaptoetilamina, Ag: antígeno, AP: fosfatasa alcalina, APTES: 3-aminopropiltriétoxosilano, BSA: albúmina de suero bovino, CNT: nanotubo de carbono, CPE: electrodo pasta de carbono, DMF: dimetilformamida, DTSP: 3-3'-Ditio-bis(ácido propiónico/N-hidroxisuccinimida), EDC: N-etil-3-[3-(dimetilamino)-propil]-carbodiimida, EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica, GA: glutaraldehído, GCE: electrodo carbono vitrificado, GOx: glucosa oxidasa, HDT: 1,6-hexanoditiol, HRP: peroxidasa de rábano, IgG: inmunoglobulina G, LD: límite de detección, MPS: mercaptopropiltrimetoxilano, MPTS: mercaptopropiltriétoxosilano, nAu: nanopartículas de oro, ODT: octadecanotiol, PBS: disolución reguladora fosfato, NHS: N-hidroxisuccinimida, pSf: polisulfona, SAM: monocapa autoensamblada, SPCE: electrodo screen-printed de carbono, TCAP: polímero ácido 5,2':5'2''-tertiofen-3'-carboxílico,.

---

*PROCEDIMIENTOS  
EXPERIMENTALES*

---

En este apartado se lleva a cabo una descripción detallada de los procedimientos experimentales empleados en este trabajo, agrupados en cuatro grandes grupos correspondientes a cada uno de los tipos de biosensores desarrollados en esta Tesis Doctoral.

## **II.1. BIOSENSOR DE TIROSINASA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

A continuación se describen detalladamente cada una de las etapas implicadas en la preparación de los biosensores. Asimismo, se comentan las técnicas empleadas para la caracterización de los bioelectrodos. Finalmente se describe el procedimiento de medida en las muestras de vino, así como el método de referencia empleado para su validación.

### **II.1.1. Preparación del electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro y Tirosinasa**

- Pretratamiento del electrodo de carbono vitrificado

Antes de llevar a cabo la modificación de la superficie electródica, es necesario aplicar un pretratamiento de limpieza para obtener una superficie “limpia” y reproducible. Para ello, se pule el electrodo [Metrohm 6.084.010 de 3 mm de de diámetro] con una suspensión acuosa de alúmina de 0.3  $\mu\text{m}$  [Metrohm] durante 1 minuto, seguidamente se lava con agua destilada, y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 30 segundos en etanol y en agua, alternativamente, repitiendo esta última etapa de lavado tres veces. Por último, se seca dicha superficie haciendo pasar una corriente de nitrógeno.

▪ Preparación del electrodo de Tir-nAu-GCE

Una vez aplicado al electrodo el pretratamiento de limpieza anterior, se procede a la modificación de la superficie electródica, siguiendo las etapas que se describen a continuación:

1<sup>a</sup>) Electrodeposición de las nanopartículas de oro sobre el electrodo de carbono vitrificado pretratado.

Se sumerge el electrodo en una disolución de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (Sigma) de 100 mg L<sup>-1</sup>, preparada mediante pesada directa de la cantidad adecuada del producto y disolución en Agua Milli Q filtrada a través de filtros de Nylon de 0.45 μm (Whatman), y se aplica un potencial de -200 mV durante 1 minuto.

2<sup>a</sup>) Inmovilización de Tirosinasa (Sigma, EC 1.14.18.1 procedente de champiñón, con una actividad de 2590 unidades por mg de sólido) sobre la superficie electródica modificada.

Se depositan sobre el electrodo 5 μL de una disolución de tirosinasa de 91.5 U μL<sup>-1</sup> preparada disolviendo la cantidad adecuada de enzima en regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4. Después de dejar secar al aire, se introduce el electrodo en una disolución de glutaraldehído al 25% (Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se aclara con agua destilada.

Con el fin de comprobar el funcionamiento del biosensor y verificar que la respuesta obtenida es reproducible, éste se sumerge en la célula de medida que contiene 10 mL de una disolución reguladora de fosfato 0.1 mol L<sup>-1</sup> de pH 7.4 agitándose con ayuda de un agitador magnético a una velocidad constante. Se aplica un potencial de -0.1 V y se mide la intensidad de corriente en estado estacionario cuando se adicionan 10 μL de una disolución de catecol 1.0 x 10<sup>-2</sup>

mol L<sup>-1</sup> (Sigma, 99%). La medida de esta señal es utilizada como valor de referencia.

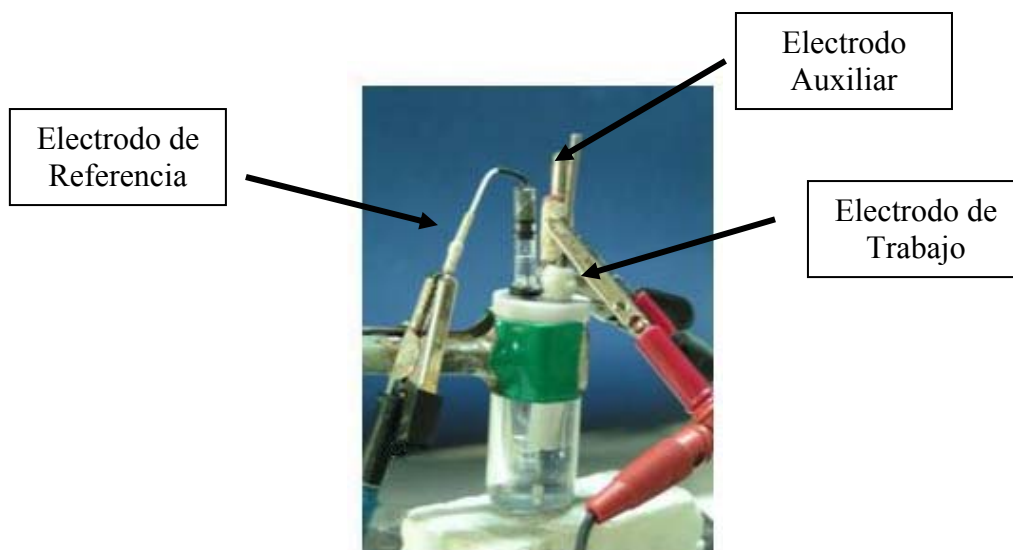
El biosensor se almacena en el frigorífico a 4° C. Antes de llevar a cabo las medidas, es necesario esperar un tiempo a que el biosensor alcance la temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, antes de su utilización, siempre se realiza la medida amperométrica de referencia para comprobar su correcto funcionamiento.

Las medidas amperométricas han sido realizadas utilizando un potencióstato Autolab PGSTAT 12 equipado con un software GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System) (*Figura 4*).



*Figura 4.- Potencióstato autolab PGSTAT 12*

El montaje potencióstático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M modelo BAS MF 2063 y un electrodo auxiliar de alambre de platino. En la *Figura 5* se muestra el dispositivo descrito.



*Figura 5.- Célula electroquímica BAS modelo VC-2*

Todas las medidas se han realizado en regulador fosfato 0.1 mol L<sup>-1</sup> de pH 7.4 a temperatura ambiente.

### **II.1.2. Caracterización del recubrimiento electródico**

Los estudios realizados en este apartado están encaminados a caracterizar el recubrimiento de la superficie del electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro (nAu-GCE) y del biosensor de tirosinasa (Tir-nAu-GCE). Para ello se han empleado diferentes técnicas electroquímicas y microscopia electrónica de barrido (SEM).

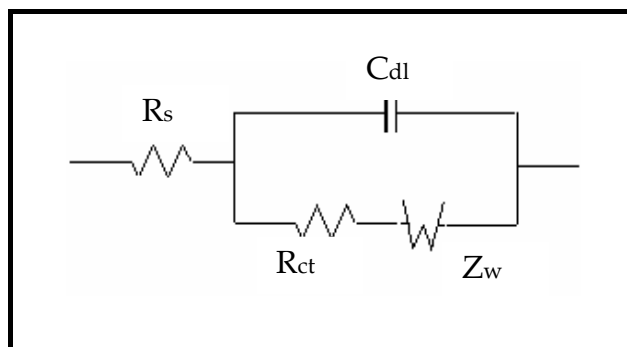
### *II.1.2.1. Determinación del recubrimiento*

La determinación de la cantidad de oro depositada sobre la superficie del electrodo de carbono vitrificado se lleva a cabo a partir del registro del voltamperograma cíclico obtenido a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  en el intervalo de potencial comprendido entre  $-0.35$  y  $+1.50 \text{ V}$  en una disolución de ácido sulfúrico  $0.1 \text{ M}$  (Sharlab, 95-97%). La reducción de los óxidos de oro formados en el barrido de oxidación da lugar a la aparición de un pico en el barrido catódico, cuya integración permite calcular la carga implicada en dicho proceso de reducción.

La comparación de la carga obtenida experimentalmente con el valor teórico de  $482 \mu\text{C} / \text{cm}^2$  para la carga asociada a la reducción de una monocapa de oxígeno divalente [Finot, 1999], permite calcular la superficie que está recubierta por nanopartículas de oro depositadas sobre el electrodo de carbono vitrificado.

### *II.1.2.2. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)*

Para poder estudiar el comportamiento de una célula electroquímica mediante esta técnica, se representa el sistema en estudio mediante un modelo o circuito equivalente. De esta forma, un sistema electroquímico simple se puede representar por una resistencia,  $R_{ct}$ , en serie con un elemento  $Z_w$  y en paralelo con un condensador,  $C_{dl}$ , que simula la interfase electrodo/disolución y está a su vez en serie con una segunda resistencia,  $R_s$ , tal como se muestra en la *Figura 6*.



*Figura 6.- Circuito equivalente de Randles*

Este circuito propuesto por Randles, explica satisfactoriamente un gran número de sistemas electroquímicos.  $R_s$  representa la resistencia óhmica entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y engloba la resistencia del electrolito, la resistencia de los hilos utilizados para conectar la célula al sistema de medida, etc. La doble capa eléctrica electrodo-disolución es como un condensador, y se representa en el circuito equivalente como  $C_{dl}$ .  $R_{ct}$  es la resistencia a la transferencia de carga ion/electrón y, por tanto, de su valor depende la velocidad de transferencia electrónica entre el electrodo y la disolución.

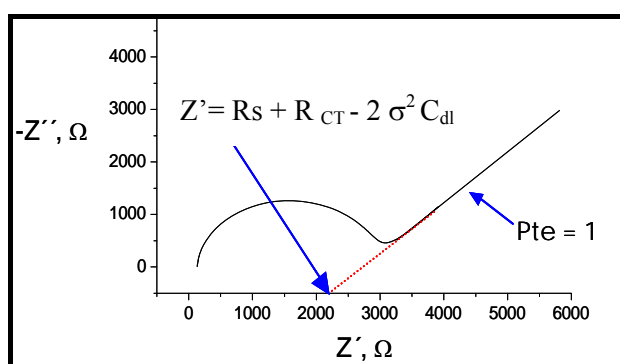
La resistencia a la transferencia de carga varía cuando sobre el electrodo se depositan o adsorben sustancias diferentes.

Las componentes  $R_s$  y  $Z_w$  representan las propiedades de la disolución del electrolito y la difusión de la especie redox en la disolución respectivamente. Estos parámetros no se ven afectados por las transformaciones químicas que ocurren en la superficie del electrodo.

Por otro lado las componentes  $C_{dl}$  y  $R_{ct}$ , dependen de las características de la interfase electrodo/electrolito, proporcionando información sobre la

existencia de cambios en las propiedades de la superficie del electrodo al inmovilizar o acoplar materiales sobre la interfase estudiada.

La representación más empleada en espectroscopia de impedancia se denomina diagrama de Nyquist, y en él se representan los valores de impedancia  $Z''$  frente a  $Z'$  obtenidos para cada valor de frecuencia aplicada. En la *Figura 7* se muestra esta representación para el circuito de Randles.



*Figura 7.-Diagrama de Nyquist*

Como puede observarse, la representación de Nyquist muestra una zona semicircular a altas frecuencias, correspondiente a un proceso limitado por transferencia electrónica, mientras que a bajas frecuencias aparece un tramo lineal de pendiente uno, que representa el proceso de transferencia electrónica limitado por difusión. En el caso en el que el proceso de transferencia electrónica sea muy rápido, el gráfico de Nyquist muestra sólo la parte lineal, mientras que si la transferencia de carga es lenta, se observa únicamente la región semicircular.

Cuando la superficie electródica es modificada con algún material, puede producirse un bloqueo de dicha superficie, impidiendo que las especies redox penetren a través del modificador hacia la superficie conductora del electrodo, observándose un aumento del diámetro de la zona semicircular.

A partir del semicírculo se pueden determinar los valores de los elementos del circuito. Así,  $R_s$  vendrá dado por el punto de corte a altas frecuencias del diagrama de impedancia con el eje real;  $R_{ct}$  coincidirá con el diámetro del semicírculo y, por último  $C_{dl}$  se puede determinar a partir de la siguiente expresión:

$$C_{dl} = \frac{1}{\omega_{max} R_{ct}} \quad \text{Ecuación [1]}$$

A diferencia de  $R_{ct}$  y  $C_{dl}$ , que son independientes de la frecuencia,  $Z_w$  es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de  $\omega$ :

$$Z_w = \frac{\sigma_w}{\omega^{1/2}} (1 - j) \quad \text{Ecuación [2]}$$

siendo  $\sigma_w$  el coeficiente de Warburg:

$$\sigma_w = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left( \frac{1}{D_O^{1/2} C_O^*} + \frac{1}{D_R^{1/2} C_R^*} \right) \quad \text{Ecuación [3]}$$

donde  $C_O^*$  y  $C_R^*$  son las concentraciones en el seno de la disolución de las especies oxidada y reducida, respectivamente.  $D_O$  y  $D_R$  son sus coeficientes de difusión,  $R$  la constante universal de los gases perfectos ( $R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura en grados Kelvin,  $n$  el número de electrones que intervienen en el proceso y  $F$  la constante de Faraday ( $96487 \text{ C mol}^{-1}$ ).

Para la obtención de los espectros de impedancia se sumerge el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar en una célula que contiene una mezcla de  $K_4Fe(CN)_6$  y  $K_3Fe(CN)_6$  1mM (Sigma) de cada uno de ellos en medio cloruro potásico 1 M (Scharlab). Las medidas se han realizado, como es habitual, superponiendo una onda sinusoidal de pequeña amplitud, 5 mV, al potencial

de equilibrio. La impedancia se ha medido a 100 valores de frecuencias en el intervalo comprendido entre 100 mHz y 10 KHz (20 frecuencias por década), tomándose para cada frecuencia el valor medio de cinco medidas realizadas de la impedancia.

Así, con fines comparativos se han obtenido los espectros de impedancia del electrodo de carbono vitrificado, así como de las superficies modificadas con nanopartículas de oro y con nanopartículas de oro y tirosinasa.

Los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica se han realizado empleando un potencióstato  $\mu$ Autolab Type III con un software FRA 2 (Ecochemie) (Figura 8).



*Figura 8.- Potencióstato  $\mu$ Autolab Type III*

### *II.1.2.3. Microscopia electrónica de barrido*

La microscopia electrónica de barrido (SEM) proporciona información sobre la morfología y topografía de la superficie de los sólidos.

Para obtener una imagen por microscopia de barrido electrónico de la superficie de un material, se focaliza sobre la muestra (de espesor suficiente para que sea opaca a los electrones) un haz de electrones acelerados por

aplicación de un alto voltaje, realizando un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas.

En microscopia electrónica se trabaja siempre a vacío para que la trayectoria de los electrones no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas que no sean de la muestra a analizar. Esto se consigue con potentes bombas de vacío, que trabajan a presiones que oscilan entre  $10^{-7}$  y  $10^{-10}$  bares.

Si la muestra no es buena conductora se acostumbra a recubrirla con una película conductora metálica o de carbono para evitar que ésta se cargue cuando sea irradiada.

De todas las formas de radiación resultantes de la interacción del haz incidente y la muestra, hay dos realmente fundamentales en microscopia de barrido: los *electrones secundarios* y los *electrones retrodispersados*. Los primeros son electrones de baja energía (decenas de eV) que resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra (los más cercanos a la superficie) debido a la colisión con el haz incidente. Los electrones retrodispersados son electrones del haz incidente que han interactuado (colisionado) con los átomos de la muestra y han sido reflejados. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir depende de la topografía de la muestra. De la señal producida por los electrones secundarios se obtiene una imagen de apariencia tridimensional de la muestra.

Para la caracterización de la superficie de los electrodos mediante esta técnica, es necesario que dicha superficie, una vez modificada, se encuentre totalmente seca, es decir, exenta de agua. Además, cuánto más conductora sea la superficie más fácilmente se obtendrán las micrografías. Por ello, previamente se introduce el electrodo en una cámara de vacío, donde se cubre con una

película de grafito de un grosor adecuado para hacer suficientemente conductora la carcasa de Teflón. A continuación, se recubren los laterales de la carcasa de Teflón, con cinta adhesiva conductora para evitar interferencias procedentes de cargas electrostáticas sobre el cuerpo de Teflón no conductor. Finalmente, el electrodo se sitúa en el compartimento para muestras del microscopio y se obtienen las micrografías correspondientes.

### **II.1.3 Medida del índice bioelectroquímico de polifenoles en vino empleando un biosensor de Tir-nAu-GCE**

La estimación del índice de polifenoles en vinos se lleva a cabo mediante amperometría en disoluciones agitadas empleando el biosensor de Tirosinasa. Dado que en todas las muestras de vino analizadas se comprobó la existencia de efecto matriz, se utilizó el método de adiciones estándar para la estimación del contenido de polifenoles en las muestras. Para ello se registran las señales amperométricas obtenidas cuando se adicionan 270  $\mu\text{L}$  de vino a la célula de medida que contiene 10 mL de la disolución reguladora fosfato 0.1 M a pH 7.4 y se realizan sucesivas adiciones de 20  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de fenol  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Las medidas amperométricas se realizan a un potencial de -0.1 V en disoluciones agitadas mecánicamente a una velocidad constante.

El contenido de compuestos fenólicos obtenido, ha sido expresado como  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cafeico.

### **II.1.4. Medida del índice de polifenoles en vino mediante el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu**

El método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, permite determinar el contenido total de compuestos fenólicos en muestras de vino. Este método utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico

(reactivo de Folin-Ciocalteu) en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno.

La aplicación de este método implica seguir el siguiente procedimiento: se adicionan 4.2 mL de agua desionizada y 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) a 0.5 mL de muestra (en el caso de vino tinto es necesario realizar una dilución de la muestra 1:8). La mezcla es agitada durante 1 minuto a velocidad constante. Seguidamente, se adiciona 1 mL de una disolución de carbonato sódico al 80% (Panreac) y 4.2 mL de agua desionizada. La disolución resultante se deja en la oscuridad durante 2 horas, con el fin de conseguir la estabilización de la reacción. Los productos obtenidos de la reacción se miden a una longitud de onda de 730 nm. Para la obtención de una curva de calibrado se aplica el mismo procedimiento empleando disoluciones patrón de diferentes concentraciones de ácido cafeico (Sigma, 99%).

Las medidas espectrofotométricas se han realizado empleando un espectrofotómetro UV- visible HP 8453.

## **II.2. PREPARACIÓN DE UN BIOSENSOR COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADO CON ORO COLOIDAL Y TIROSINASA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN MUESTRAS AMBIENTALES**

En este apartado se describen los procedimientos seguidos para la preparación del biosensor, incluyendo la preparación del oro coloidal; así como el método empleado para calcular la actividad enzimática del biosensor. Seguidamente se describen los procedimientos utilizados para calcular el área electroquímica del electrodo, así como las experiencias realizadas para el cálculo del coeficiente de difusión del fenol y del coeficiente de transferencia electrónica. Por último, se describen los procedimientos aplicados a la estimación del contenido total de compuestos fenólicos en muestras de aguas y de alpechín.

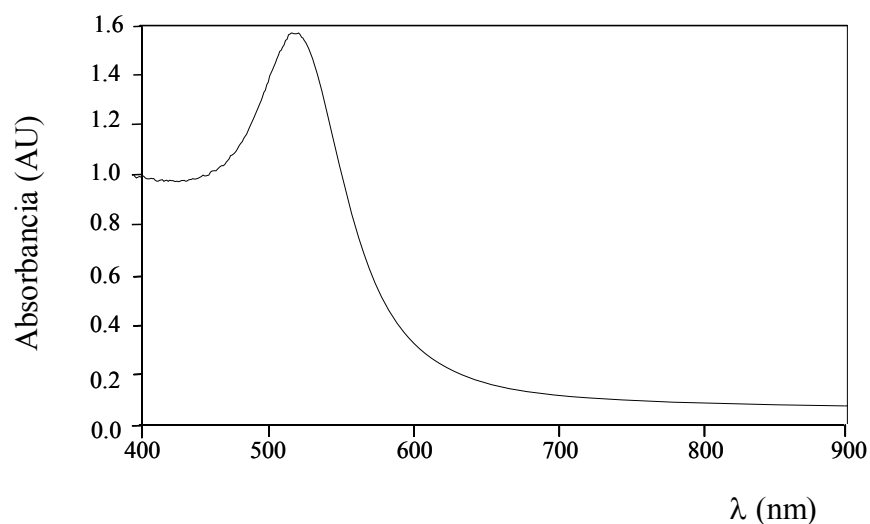
### **II.2.1. Preparación del biosensor compuesto Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón**

Con el fin de preparar un biosensor compuesto de grafito-Teflón modificado con oro coloidal y Tirosinasa, es necesario en primer lugar preparar una *disolución de oro coloidal*. Para ello es necesario que el material de vidrio a utilizar se haya limpiado previamente con agua regia, aclarando varias veces con agua Milli Q previamente filtrada a vacío empleando un filtro de Nylon de tamaño de poro de 0.1  $\mu\text{m}$  (Scharlab). Después el material se deja secar al aire durante 48 horas antes de su utilización.

Seguidamente se preparan las disoluciones de ácido tetracloroaurico (Sigma, 99%) al 1% y de citrato sódico (Sigma, 99%) al 1% y se filtran a través de una membrana microporosa de 22  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se calienta hasta ebullición en vaso de precipitados una mezcla de 50 mL de agua Milli Q y 0.5 mL de H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub> al 1%. Tras hervir durante 15 minutos, se adicionan 1.25 mL de la disolución de citrato sódico al 1% (Sigma, 99%), agitando vigorosamente con una varilla de vidrio. Tras unos minutos, la disolución cambia de color adquiriendo finalmente un color rojo rubí característico. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar y se agita con la varilla de vidrio durante 15 minutos más. Finalmente la disolución de oro coloidal se almacena en un recipiente de color topacio a 4°C.

La disolución de oro coloidal fue caracterizada mediante espectrofotometría UV, observándose en el espectro correspondiente que se muestra en la *Figura 9* la aparición de un máximo de absorción a 519 nm, característico de nanopartículas de oro con un tamaño medio de 16 nm [Wang L., 2006].

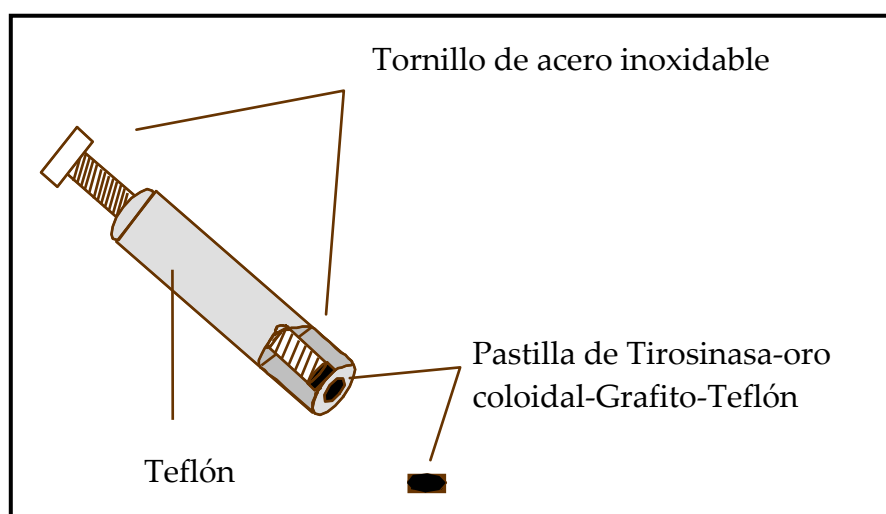


*Figura 9.- Espectro de absorción del oro coloidal*

La preparación de las *pastillas de Tirosinasa-oro coloidal-grafito-Teflón (70%)* se realizó aplicando el siguiente procedimiento: se mezclan 150 mg de grafito (Ultra Carbon, BayCity, MI, USA) y 900 µL de la disolución de oro coloidal mediante agitación mecánica a una temperatura de 4°C durante 2 horas.

Seguidamente, se evapora el agua mediante el paso de una corriente de nitrógeno a través de la mezcla y se adicionan 34.75 mg de tirosinasa de 2590 unidades  $\text{mg}^{-1}$  en una suspensión de 0.4 mL de una disolución reguladora de fosfato 0.1 M a pH 7.4, agitando mecánicamente durante 2 horas a 4°C. Por último, se mezcla manualmente con 415.25 mg de Teflón (Aldrich), y se procede a la compresión mecánica de la mezcla. A partir de la pastilla madre obtenida se preparan varias pastillas más pequeñas, de 3.0 mm de diámetro con ayuda de un troquel y se colocan en el extremo de un tubo de Teflón como puede apreciarse en la *Figura 10*. El contacto eléctrico se establece a través de un tornillo de acero inoxidable con punta plana que es introducido por el otro extremo del tubo de Teflón.

Con fines comparativos, se prepararon pastillas de grafito-Teflón-oro coloidal en ausencia de enzima.



*Figura 10.- Esquema del electrodo compuesto*

## II.2.2. Cálculo de la actividad enzimática

La respuesta amperométrica de los biosensores compósitos de Tirosinasa depende de la cantidad de enzima inmovilizada en la superficie del electrodo. La actividad enzimática superficial se ha estimado midiendo el incremento de

absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, que se produce cuando se introduce el electrodo durante 10 minutos en una disolución agitada de regulador fosfato 0.05 M de pH 6.5 conteniendo L-tirosina (Merck)  $5.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Cuando se realizan las medidas, los electrodos no están sometidos a ningún potencial eléctrico, por lo que el producto de la reacción no es reducido posteriormente y por lo tanto, no se produce reciclado del sustrato. De esta manera, la respuesta obtenida es directamente proporcional a la cantidad de enzima activa en la superficie del biosensor.

Como consecuencia de lo comentado, los valores del incremento de absorbancia obtenidos en cada caso se relacionan con la actividad enzimática mediante una curva de calibrado, en la que se representan dichos incrementos de absorbancia en función de la actividad enzimática que se obtiene utilizando disoluciones de L-tirosina que contienen cantidades conocidas de tirosinasa en disolución. En este caso el calibrado ha sido preparado con disoluciones de tirosinasa entre 0 y 200 unidades de enzima.

### **II.2.3. Cálculo del área electroquímica de los electrodos de grafito-Teflón y grafito-Teflón-oro coloidal mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría**

El área electroquímica o área activa de un electrodo compósito no corresponde en principio al área geométrica, puesto que la superficie está compuesta por material aislante y material conductor. Dependiendo de la proporción y distribución de ambos materiales en la superficie, el área activa será diferente.

El cálculo del área electroquímica de los electrodos se ha llevado a cabo mediante voltamperometría cíclica, empleando la ecuación de Randles-Sevcik para una pareja redox reversible, que a 25°C, y suponiendo un electrodo plano y un proceso difusivo de la especie electroactiva, es:

$$i_p = (2.69 \times 10^{-5}) n^{3/2} A D^{1/2} C_{\infty} v^{1/2} \quad \text{Ecuación [4]}$$

En la ecuación anterior,  $i_p$  es la corriente de pico (A),  $n$  es el número de electrones transferidos en el proceso,  $A$  es el área electroquímica del electrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C_{\infty}$  es la concentración en disolución de la misma especie ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), y  $v$  es la velocidad de barrido de potencial ( $\text{V s}^{-1}$ ). Para ello, se registran los voltamperogramas cíclicos sobre los electrodos de grafito-Teflón y grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro en una disolución acuosa de ferrocianuro potásico  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl 1 M, cuyo coeficiente de difusión es de  $6.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a 25°C [Bard, 2001].

Asimismo, se ha calculado el área electroquímica de los electrodos anteriores mediante cronoamperometría, empleando una disolución de ferrocianuro potásico, sin agitación y aplicando un salto de potencial de 0.3 a 0.45 V. La variación de la corriente con el tiempo viene dada por la ecuación de Cottrell,

$$i_d(t) = \frac{n F A D_{Ox}^{1/2} C^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad \text{Ecuación [5]}$$

donde  $i_d(t)$  viene expresada en A, el área del electrodo en  $\text{cm}^2$ ,  $C^*$  en  $\text{mol cm}^{-3}$  y  $D$  en  $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . El área del electrodo se obtiene a partir de la pendiente de la representación de la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo.

#### **II.2.4. Cálculo del coeficiente de difusión del fenol**

Se ha determinado el coeficiente de difusión del fenol mediante cronoamperometría empleando disoluciones de fenol de diferente concentración y como electrodos de trabajo un electrodo de grafito-Teflón ó de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro.

La pendiente de la representación de la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo permite, una vez conocida el área del electrodo, calcular el coeficiente de difusión [Zare, 2006].

#### **II.2.5. Cálculo del coeficiente de transferencia electrónica para el fenol**

El cálculo del coeficiente de transferencia electrónica ( $\alpha_n a$ ) para el fenol se ha calculado a partir del cálculo de las pendientes de Tafel ( $\text{pte} = 2.303 R T / \alpha_n a F$ ) obtenidas a diferentes velocidades de barrido de potencial. Para ello, se representa el logaritmo de la intensidad frente al potencial, tomando medidas de la corriente en la región del voltamperograma en la que la intensidad es inferior al 10% de la corriente de pico, zona donde la respuesta está afectada únicamente por la cinética de transferencia electrónica entre la especie electroactiva y la superficie del electrodo.

Para ello se han registrado voltamperogramas cíclicos para fenol  $5 \times 10^{-4}$  M en medio Tris 0.1 M de pH 7.0 a diferentes velocidades de barrido, empleando como electrodo de trabajo un electrodo de grafito-Teflón ó un electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro.

#### **II.2.6. Estimación del contenido total de compuestos fenólicos en aguas**

El contenido total de fenoles ha sido estimado en varios tipos de aguas, una sintética enriquecida con una mezcla de compuestos fenólicos formada por

1.0  $\mu\text{M}$  fenol (Scharlab, 99.5%), 2.5  $\mu\text{M}$  de 3,4-dimetilfenol (Sigma, 99%) y 1.0  $\mu\text{M}$  de 4-cloro-2-metilfenol (Aldrich, 99%), y tres muestras procedentes de una refinería, recogidas en diferentes días y en diferentes etapas del proceso de purificación. La determinación del contenido fenólico en las diferentes muestras se ha llevado a cabo mediante amperometría en disoluciones agitadas empleando para ello el biosensor compuesto desarrollado. Los resultados obtenidos se han comparado con los proporcionados por el método oficial espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina.

A continuación se describen los procedimientos utilizados para el análisis de cada una de las muestras aplicando los métodos comentados anteriormente.

*a) Determinación mediante amperometría en disoluciones agitadas.*

Para la determinación del contenido de fenoles en las muestras de aguas procedentes de una refinería, se sumergen el biosensor y los electrodos de referencia y auxiliar en una célula electroquímica que contiene 10 mL de regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4 y se aplica un potencial de -0.1 V.

Una vez estabilizada la corriente de fondo, se adicionan a la célula de medida 200  $\mu\text{L}$  de la muestra sin diluir y se mide la corriente en estado estacionario. Seguidamente se aplica el método de adiciones estándar realizando adiciones sucesivas de una disolución patrón de fenol  $1.0 \times 10^{-4}$  M.

*b) Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina*

El método de la 4-aminoantipirina es adecuado para la determinación de fenoles *orto* y *meta* sustituidos y, en condiciones adecuadas de pH, los sustituidos en posición *para* por un grupo carboxido, halógeno, metoxilo ó ácido sulfónico. Sin embargo, presenta el inconveniente de no determinar los fenoles

en los que la posición *para* se encuentra sustituida por un grupo alquilo, arilo, nitro, nitroso ó aldehído.

Aunque el método requiere procesos previos de destilación y extracción y largos tiempos de análisis, es muy sensible y se trata de un método estandarizado que está incluido en el compendio "Standard Methods for the analysis of Water and Wastewater", [APHA, 1981], siendo oficial en EE.UU, [APHA, 1985], y en las normas internacionales [ISO, 1990]. Los resultados obtenidos proporcionan una precisión del 30%, una exactitud del 50 % y un límite de detección de  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$

El procedimiento seguido consiste, en primer lugar, en la realización de un calibrado para fenol en el intervalo de concentración comprendido entre 0.05 y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Cada disolución de fenol se trata con 1.2 mL de una disolución de hidroxilamina  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  (Panreac), ajustándose el pH a  $7.9 \pm 0.1$  con regulador fosfato 0.1 M. A continuación, se añaden 3.0 mL de disolución de 4-aminoantipirina (Aldrich) y 3.0 mL de una disolución de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  de concentración 0.24 M, se agita la mezcla y se espera durante 3 minutos, obteniendo una disolución de color ligeramente amarillento. Seguidamente, se transfiere cada disolución a un embudo de decantación, realizándose la extracción de los compuestos fenólicos con 5 mL de cloroformo (Sharlab). La fase orgánica se filtra a través de un filtro ó embudo de filtración de vidrio fritado que contiene una capa de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Se mide la absorbancia del extracto clorofórmico a 460 nm. El equipo empleado para realizar las medidas espectrofotométricas es un espectrofotómetro UV- visible HP 8453.

En el caso de las muestras, antes de llevar a cabo el método de la 4-aminoantipirina es necesario realizar una etapa previa de destilación, con el fin

de separar las impurezas no volátiles de los compuestos fenólicos que posteriormente se medirán por espectrofotometría.

Para llevar a cabo la destilación se toman 500 mL de muestra en un matraz y se ajusta a un pH de 4.0 con ácido fosfórico (Scharlab, ACS 85%). Si la muestra ha sido perfectamente conservada no es necesario añadir el ácido fosfórico.

A continuación se destila hasta 450 mL, se para la destilación y cuando haya cesado la ebullición se añaden 50 mL de agua caliente al matraz de destilación hasta recoger 500 mL. Generalmente, es suficiente con una destilación, pero en el caso en que el destilado presente turbidez, se debe acidificar con ácido fosfórico volviéndose a destilar.

Una vez purificados los fenoles se hacen reaccionar con la disolución de 4-aminoantipirina siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para la preparación del calibrado.

*c) Análisis de las muestras de agua mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas*

Con el fin de identificar los compuestos presentes en las muestras de agua procedentes de la refinería se procedió a su análisis mediante cromatografía de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas. Para ello es necesario aplicar a la muestra un tratamiento previo. Se toman 250 mL del agua y se le añade 1 gota de ácido ortofosfórico. Este volumen se pasa a través de un cartucho de 500 mg de C18 que previamente se ha acondicionado con 6.0 mL de metanol (Sharlab) y 3.0 mL de agua destilada. Los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho se eluyen con 5+1 mL de diclorometano (Sharlab). Finalmente, la disolución obtenida se concentra hasta un volumen de 0.5 mL

haciendo pasar una corriente de nitrógeno. La disolución resultante es inyectada directamente en el cromatógrafo de gases.

El análisis se ha realizado utilizando un espectrómetro de masas de cuadrupolo HP5989A, acoplado a una columna cromatográfica de gases HP5890. La identificación se realizó mediante el empleo de una librería Wily HP59943B.

### **II.2.7. Estimación del contenido total de compuestos fenólicos en muestras de alpechín**

La determinación del índice de polifenoles en muestras de alpechín se ha llevado a cabo, empleando el biosensor compuesto anteriormente descrito, mediante amperometría en disolución agitada. Para ello, se adiciona una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  de muestra a la célula de trabajo, que contiene 10 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4. Las medidas amperométricas se realizan aplicando un potencial de -0.1 V. Para la estimación del contenido de compuestos fenólicos en alpechín se emplea el método de adiciones estándar. Para ello se realizan adiciones sucesivas de 20  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de ácido cafeico 1.0 mM (Sigma, 99%).

Los resultados obtenidos se compararon con los del método espectrofotométrico Folin Ciocalteau, descrito en el apartado II.1.4.

### **II.3. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES COMPÓSITOS DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADOS CON ORO COLOIDAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN LECHE**

A continuación se describen los procedimientos experimentales relacionados con la preparación de los inmunosensores para la determinación de Progesterona, incluyendo la preparación de los mismos, así como la

realización del inmunoensayo correspondiente. Se describe también el cálculo de algunos parámetros de interés para el naftol, producto de la reacción enzimática del naftilfosfato con la enzima fosfatasa alcalina. Finalmente se detalla el procedimiento seguido para la determinación de la concentración de progesterona en muestras de leche.

### **II.3.1. Preparación del inmunosensor basado en un electrodo Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón**

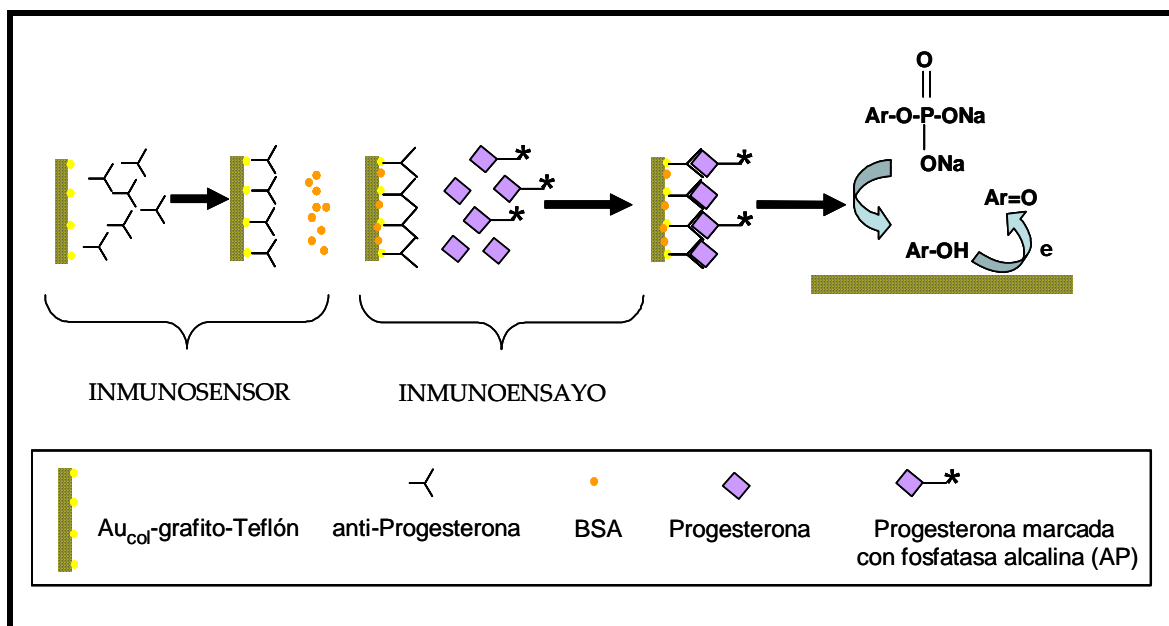
Las pastillas de grafito-Teflón modificadas con oro coloidal se preparan siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el apartado II.2.1., obviamente en ausencia de tirosinasa. Para construir el inmunosensor, se depositan sobre la superficie del electrodo compuesto 5  $\mu\text{L}$  de una disolución 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de anti-Progesterona (anti-Prog) (Sigma), dejándose secar a temperatura ambiente. Después se sumerge el inmunosensor en una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) (Merck, 97%) al 2% preparada en un regulador de dietanolamina (DEA) (Merck, 98%)- HCl 0.1 M de pH 7.2 durante 5 minutos, con el fin de minimizar posibles adsorciones inespecíficas. Finalmente, se lava cuidadosamente el inmunosensor con una disolución reguladora de dietanolamina de pH 10.0.

### **II.3.2. Realización del inmunoensayo competitivo simultáneo**

Para llevar a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo simultáneo se depositan sobre la superficie del inmunosensor 8  $\mu\text{L}$  de una mezcla de Progesterona marcada con fosfatasa alcalina (Prog-AP) (Ridgeway Science Ltd) y Progesterona (Prog) (Aldrich, 98%), al nivel de concentración deseado, en una proporción 5:3. Seguidamente se deja secar durante dos horas a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C.

La detección electroquímica de la progesterona se realiza sumergiendo el inmunosensor en la célula de trabajo que contiene 10 mL de una disolución de dietanolamina-HCl 0.1 M de pH 10 y 1mM de  $\text{MgCl}_2$  (Merck, 99%) y se aplica un potencial de + 0.3 V agitando la disolución a velocidad constante. Cuando la corriente se estabiliza, se adicionan a la célula de medida 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de 1-naftilfosfato (Fluka > 98 %) 0.1 M, monitorizándose la oxidación del naftol, generado en la reacción enzimática, que se produce en la superficie del electrodo.

El proceso completo, incluyendo la preparación el inmunosensor, la realización del inmunoensayo, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato de la fosfatasa alcalina se muestra en el *Esquema 1*.



Esquema 1-. Inmunoensayo competitivo simultáneo para la determinación de Progesterona

### II.3.3. Cálculo del coeficiente de difusión del naftol

Se ha llevado a cabo el cálculo del coeficiente de difusión del naftol mediante cronoamperometría empleando disoluciones de naftol de diferente concentración y utilizando como electrodos de trabajo un electrodo de grafito-Teflón ó de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro.

Una vez conocida el área del electrodo y a partir de la pendiente obtenida al representar la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo, se calcula el coeficiente de difusión.

### II.3.4. Cálculo del coeficiente de transferencia electrónico del naftol

El cálculo del coeficiente de transferencia electrónica del naftol se ha llevado a cabo mediante el cálculo de las pendientes de Tafel siguiendo el procedimiento indicado en el apartado II.2.5.

Este parámetro también puede calcularse a partir de la representación de la intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, que para sistemas irreversibles a 25°C, viene dada por la ecuación:

$$i_p = (2.99 \times 10^{-5}) n (\alpha n_a)^{1/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Ecuación [6]}$$

donde  $i_p$  es la corriente de pico (A),  $n$  el número de electrones transferidos en el proceso,  $\alpha$  el coeficiente de transferencia de carga,  $n_a$  es el número de electrones implicados en la etapa determinante de la velocidad del proceso electroquímico,  $A$  el área del electrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C$  la concentración en disolución del naftol ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) y  $v$  es la velocidad de barrido de potencial ( $\text{V s}^{-1}$ ).

Por último, también es posible calcular el valor de  $\alpha n_a$  midiendo los potenciales de pico y semipico correspondientes a la oxidación del naftol, relacionados mediante la ecuación:

$$\alpha n_a = \frac{47.7}{(E_p - E_{p/2})} \quad \text{Ecuación [7]}$$

donde los parámetros  $\alpha$  y  $n_a$  son los especificados anteriormente.

Para ello se han registrado voltamperogramas cíclicos de una disolución de naftol  $5 \times 10^{-4}$  M en medio dietanolamina 0.1 M de pH 10.0, empleando como electrodos de trabajo un electrodo de grafito-Teflón ó de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro.

### **II.3.5. Preparación del inmunosensor basado en el empleo de un biosensor de Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón como transductor**

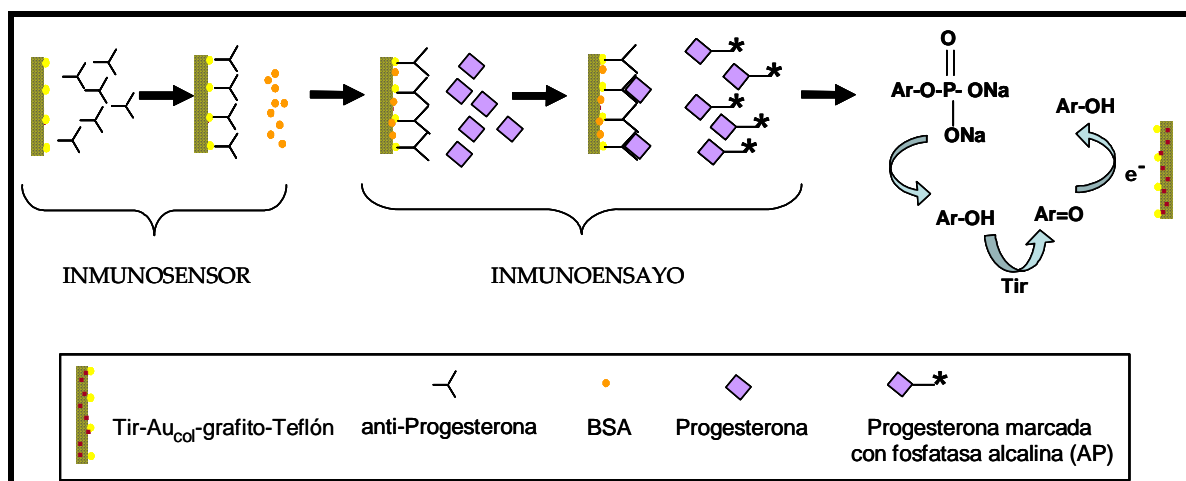
Sobre la superficie del biosensor (Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón) se depositan 5.2 µL de una disolución de anti-Progesterona 0.01 mg mL<sup>-1</sup> obtenida por dilución de la disolución patrón con regulador TRIS (tris(hidroximetil)aminometano)(Sigma, 99.9%) 0.1 M de pH 7.0 y se deja secar a temperatura ambiente. Se sumerge durante 10 minutos en una disolución de BSA al 2% y se lava con la disolución reguladora de pH 7.0.

Para realizar un seguimiento de cada una de las etapas de modificación de la superficie electródica mediante la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se sumerge el electrodo, tras cada etapa, en la célula electroquímica que contiene K<sub>3</sub>(Fe (CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub> en concentración 5 mM de cada uno de ellos en medio cloruro potásico 0.1 M, y se registra el espectro de impedancia tal y como se describe en el apartado II.1.2.2.

Una vez preparado el inmunosensor, se lleva a cabo el inmunoensayo, en este caso de tipo competitivo secuencial. Para ello, se sumerge el inmunosensor en 10 mL de una disolución de Progesterona de concentración variable durante 30 minutos. Seguidamente se lava y se incuba en una disolución de progesterona marcada con fosfatasa alcalina durante 40 minutos.

La detección electroquímica se realiza mediante amperometría, sumergiendo el inmunosensor en una célula que contiene 10 mL de una disolución TRIS 0.1 M de pH 7.0 que contiene 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y se aplica un potencial de -0.1 V. Cuando la corriente se estabiliza, se adicionan 20 µL de una disolución 0.01 M de fenilfosfato (Sigma, 98%) como sustrato de la fosfatasa alcalina. La determinación se lleva a cabo aplicando un potencial de -0.1 V,

mediéndose la reducción de la *o*-quinona generada por la tirosinasa como producto de la reacción enzimática del fenol (*Esquema 2*).



*Esquema 2.- Inmunoensayo competitivo secuencial para la determinación de Progesterona*

### II.3.6. Determinación de progesterona en leche

#### Inmunosensor basado en un biosensor compuesto Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón

La determinación de Progesterona se realiza en muestras de leche enriquecidas a un nivel de concentración de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ . El procedimiento seguido se describe a continuación. Se diluyen  $285 \mu\text{L}$  de leche enriquecida con una disolución reguladora de dietanolamina  $0.1 \text{ M}$  hasta un volumen final de  $1000 \mu\text{L}$ . Seguidamente se mezcla una alícuota de  $3 \mu\text{L}$  de la muestra diluida ( $3.5 \text{ ng Prog/mL}$ ) con  $5 \mu\text{L}$  de progesterona marcada con fosfatasa alcalina y se depositan sobre la superficie del inmunosensor. Las medidas amperométricas se realizan aplicando un potencial de  $+0.3 \text{ V}$ , adicionando  $500 \mu\text{L}$  de una disolución de 1-naftilfosfato  $0.1 \text{ M}$  como sustrato de la enzima.

Como consecuencia del efecto matriz observado, debido principalmente a la presencia de proteínas, grasas y otras sustancias, se procede a realizar un

calibrado de progesterona en leche exenta del analito. A continuación, el valor de la intensidad de corriente obtenida para 7 muestras de leche enriquecida, se interpoló en la recta de calibrado de progesterona, obteniéndose la concentración del analito presente en la muestra.

*Inmunosensor basado en un biosensor compuesto de Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón*

El inmunosensor desarrollado empleando un biosensor de tirosinasa nanoestructurado como transductor, se aplicó a la determinación de Progesterona en muestras de leche enriquecidas a dos niveles de concentración, 5.0 y 1.5 ng mL<sup>-1</sup>. En este caso, no fue necesario realizar ninguna dilución de la muestra.

Una vez preparado el inmunosensor, se incubó durante 30 minutos, en la muestra de leche. A continuación, se lava y se sumerge en 10 mL de disolución de progesterona marcada con fosfatasa alcalina durante 40 minutos. La concentración de progesterona se analiza midiendo a -0.1 V la reducción de la *o*-quinona generada por la tirosinasa al adicionar 20 µL de fenilfosfato 0.01M.

## **II.4. INMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA INMUNOGLOBULINA G UTILIZANDO COMO TRANSDUCTOR UN BIOSENSOR DE TIROSINASA-ORO COLOIDAL-GRAFITO-TEFLÓN**

### **II.4.1. Preparación del inmunosensor**

El procedimiento seguido para la fabricación del inmunosensor implica seguir una serie de etapas. En primer lugar se incubaba el biosensor compuesto de Tirosinasa (Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón) en una disolución de Proteína A al 2% (Sigma) en disolución reguladora 0.1 M de pH 7.0, con el fin de conseguir una adecuada orientación de la inmunoglobulina G sobre la superficie del biosensor.

A continuación se depositan 2.6  $\mu\text{L}$  de una disolución de anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) (Sigma) 0.11 mg mL<sup>-1</sup> sobre la superficie del bioelectrodo y se deja secar a temperatura ambiente [anti-IgG(Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón)]. La anti-inmunoglobulina G comercial es previamente reconstituida disolviendo una cantidad del sólido en el volumen adecuado de cloruro sódico 0.135 M para obtener una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>. La disolución 0.11 mg mL<sup>-1</sup> se obtiene por dilución de la anterior con disolución reguladora TRIS 0.1 M de pH 7.0.

Seguidamente, la superficie eléctrica, modificada con Proteína A y el anticuerpo, se sumerge en 5 mL de una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% durante 15 minutos, con el fin de disminuir posibles adsorciones inespecíficas que podrían darse a la hora de llevar a cabo el inmunoensayo. Transcurrido el tiempo de incubación, se lava cuidadosamente la superficie, empleando para ello una disolución reguladora de TRIS 0.1 M de pH 7.0.

#### **II.4.2. Realización del inmunoensayo tipo sándwich**

Una vez preparado el inmunosensor [anti-IgG(Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón)], éste se incuba en una disolución del analito (IgG), durante 35 minutos. Para llevar a cabo la reconstitución de la inmunoglobulina G (Sigma), se disuelve el sólido en el volumen adecuado de cloruro sódico 0.150 M para obtener una disolución de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Disoluciones más diluidas se preparan por dilución de la disolución patrón en disolución reguladora.

Por último, el inmunosensor se sumerge en 10 mL de una disolución de anti-inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina (anti-IgG-AP) (Sigma) de 1700 ng mL<sup>-1</sup> durante 40 minutos.

Para llevar a cabo la detección de inmunoglobulina G, se sumerge el inmunosensor en 10 mL de regulador TRIS 0.1 M de pH 7.0 y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. La detección amperométrica se realiza a un potencial de -0.1 V, midiéndose la reducción de la *o*-quinona generada por la tirosinasa cuando se adicionan 20 μL de disolución de fenilfosfato 1x10<sup>-3</sup>M.

Al igual que anteriormente, las diferentes etapas implicadas en la preparación del inmunosensor, así como las realizadas para llevar a cabo el inmunoensayo se monitorizan mediante espectroscopia de impedancia electroquímica tal y como se describe en el apartado II.1.2.2.

#### **II.4.3. Determinación de inmunoglobulina G en sueros**

El inmunosensor desarrollado se aplicó a la determinación de inmunoglobulina G en dos muestras de suero diferentes. El primero de ellos (Interchim) fue enriquecido a un nivel de concentración de 10 ng mL<sup>-1</sup>, y el

segundo, consistió en un suero certificado conteniendo una cantidad de inmunoglobulina G de 3118 mg dL<sup>-1</sup> (Spinreact).

Una vez preparado el inmunosensor, se incubó durante 35 minutos en la muestra de suero enriquecido. Seguidamente, se lava con disolución reguladora TRIS 0.1 M de pH 7.0 y se sumerge durante 40 minutos en 10 mL de anti-inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina de concentración 1700 ng mL<sup>-1</sup>. La concentración de IgG se determinó sumergiendo el inmunosensor en 10 mL de disolución reguladora TRIS 0.1 M de pH 7.0 que contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La detección amperométrica se realiza midiendo a -0.1 V la reducción de la *o*-quinona generada por la tirosinasa al adicionar 20 µL de una disolución de fenilfosfato 1×10<sup>-3</sup> M. El valor de la intensidad de corriente obtenida se interpoló en la recta de calibrado obtenida en suero exento de IgG, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.4.2.

Para la determinación de IgG en la muestra de suero certificada fue necesario realizar dos diluciones previas de la muestra con disolución reguladora TRIS 0.1 M de pH 7.0 en un factor de 1:1000. El procedimiento seguido fue el mismo que el descrito para el suero enriquecido.

---

*RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN INTEGRADA*

---

Como ya se ha puesto de manifiesto en la Introducción, la modificación de superficies electródicas con nanopartículas de oro permite la inmovilización estable de moléculas biológicas y por tanto constituye una estrategia atractiva para la construcción de biosensores electroquímicos. Así, se ha demostrado que biomoléculas como anticuerpos, antígenos o enzimas, retienen su actividad biológica cuando son inmovilizadas sobre superficies modificadas con nanopartículas, ya que éstas proporcionan un microambiente similar a su entorno natural. Además dichas nanopartículas actúan como medio de conducción electrónico, facilitando la transferencia electrónica, alcanzándose elevados niveles de estabilidad y sensibilidad.

Teniendo en cuenta las interesantes ventajas de las nanopartículas de oro, en este trabajo se han desarrollado diferentes configuraciones de biosensores enzimáticos, así como varios inmunosensores basados en electrodos modificados con este nanomaterial. A continuación se discuten los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos, agrupándolos en dos partes principales:

- Biosensores de Tirosinasa utilizando diferentes superficies electródicas modificadas con nanopartículas de oro.
- Inmunosensores basados en el empleo de electrodos compósitos nanoestructurados.

### **III.1. BIOSENSORES DE TIROSINASA BASADOS EN EL EMPLEO DE DIFERENTES SUPERFICIES ELECTRÓDICAS MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

Como ya se ha comentado en el apartado de Procedimientos Experimentales, los biosensores preparados en este trabajo se basan en el empleo de diferentes estrategias de modificación de la superficie electródica.

En la primera de ellas se lleva a cabo la modificación de un electrodo de carbono vitrificado en dos etapas secuenciales: electrodeposición de nanopartículas de oro, a partir de una disolución de  $\text{HAuCl}_4$ ; las características del recubrimiento se controlan con el potencial aplicado y el tiempo de electrodeposición y la enzima se inmoviliza por adsorción sobre el electrodo modificado.

El segundo diseño se basa en el empleo de un electrodo compuesto de grafito y Teflón en el que tanto las nanopartículas de oro como la enzima forman parte de la matriz tridimensional mediante simple inclusión física.

En los apartados que se exponen a continuación se comentan algunos de los aspectos más relevantes de cada uno de los dos diseños de biosensores de tirosinasa, así como algunos resultados experimentales que no se recogieron en las publicaciones correspondientes. Finalmente se establecerá una comparación entre las características operacionales de ambos tipos de biosensores comentándose las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

### **III.1.1. BIOSENSOR DE TIROSINASA BASADO EN EL EMPLEO DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO ELECTRODEPOSITADAS**

Se llevaron a cabo diversos estudios encaminados a la caracterización de la superficie electródica de carbono vitrificado modificada con nanopartículas de oro, así como del propio biosensor de tirosinasa (Tir-nAu-GCE), empleando para ello diferentes técnicas electroquímicas. Los resultados obtenidos se comparan con los correspondientes a la misma superficie en ausencia del nanomaterial, con objeto de poner de manifiesto las diferencias y las ventajas del diseño basado en el empleo de nanopartículas de oro.

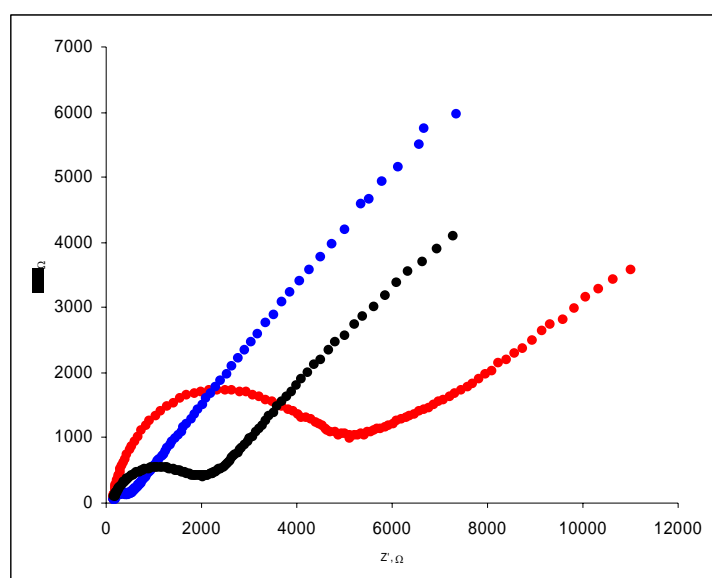
#### **III.1.1.1. Caracterización mediante técnicas electroquímicas**

La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica se utiliza, entre otras cosas, para reconocer la presencia de especies conductoras y/o no conductoras sobre una superficie electródica, lo que origina un cambio en el valor de la resistencia a la transferencia de carga. Esta técnica es ampliamente utilizada para realizar un seguimiento de cada una de las etapas implicadas en la construcción de biosensores. A continuación, se reseñan los resultados obtenidos mediante esta técnica, que no aparecen en los artículos publicados y se comparan con los obtenidos mediante voltamperometría cíclica.

En la *Figura 11* se representan los gráficos de Nyquist correspondientes a un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro (nAu-GCE), así como a un biosensor de tirosinasa (Tir-nAu-GCE). Con fines comparativos se muestra también el diagrama de Nyquist correspondiente a un electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE).

Como puede observarse, el gráfico de Nyquist para el electrodo de carbono vitrificado muestra una región circular mayor que en presencia de las

nanopartículas de oro, donde se obtiene un diagrama de Nyquist semejante al correspondiente a una superficie de oro convencional con un semicírculo de pequeño diámetro, lo que pone de manifiesto una disminución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al electrodo sin modificar, y un tramo lineal de pendiente próxima a la unidad ( $m = 0.931$ ;  $r = 0.9999$ ) en un amplio intervalo de frecuencias, característico de sistemas en los que la corriente está controlada por difusión [Lu, 2002]. Por otro lado, el biosensor de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa presenta un semicírculo de mayor diámetro que el obtenido en ausencia de la enzima y con el electrodo sin modificar.



**Figura 11.-** Diagramas de Nyquist de (●) GCE, (●) nAu-GCE y (●) Tir-nAu-GCE en disolución  $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$  5mM en KCl 1 M.

Como se describe en los Procedimientos experimentales, a partir de las gráficas de Nyquist se puede calcular la *resistencia a la transferencia de carga* y la *capacidad de la doble capa*. Así, el valor de dicha resistencia para el nAu-GCE es de  $259 \Omega$ , muy inferior al valor de  $1768 \Omega$  obtenido para el GCE. Estos resultados demuestran que cuando se modifica el electrodo de carbono vitrificado con nanopartículas de oro, se facilita la transferencia electrónica.

Para el biosensor Tir-nAu-GCE, la representación de Nyquist revela, como era de esperar, una resistencia a la transferencia de carga mayor que en ausencia de la enzima ( $R_{ct} = 4338 \Omega$ ) dado el efecto bloqueante de la capa de biomolécula sobre la superficie electródica modificada.

Por otra parte, la presencia de semicírculos “deprimidos” en la zona de altas frecuencias de los diagramas de Nyquist implica una desviación del comportamiento capacitivo ideal de la interfase electrodo-disolución, habitual en electrodos sólidos. Esta desviación se compensa sustituyendo en el circuito de Randles el condensador por un elemento de fase constante, CPE, que se origina como consecuencia de la modificación de la distribución de carga de la doble capa debida a la rugosidad y a la distribución de sitios activos en la superficie electródica. Este fenómeno es particularmente importante cuando se incorpora una capa de proteína sobre la superficie [Katz, 2003].

La expresión matemática correspondiente al elemento de fase constante es:

$$CPE = \frac{1}{A(j\omega)^n} \quad \text{Ecuación [8]}$$

donde el parámetro  $n$  refleja la desviación del comportamiento de la interfase del circuito de Randles, con un valor comprendido entre  $0.5 < n < 1$ . En el caso de que  $n$  sea igual a la unidad, la superficie es completamente lisa y el elemento de fase constante es un condensador, siendo  $A$  la capacidad de la doble capa  $C_{dl}$ . A medida que aumenta la rugosidad el valor de  $n$  se aproxima a 0.5

Los valores de  $n$  obtenidos son de  $n= 0.69$  y  $0.97$  para un electrodo de GCE y nAu-GCE respectivamente, por lo que en el caso del electrodo de carbono vitrificado y en contraposición al electrodo modificado con

nanopartículas de oro, es necesario sustituir el condensador por un elemento de fase constante (CPE), como ocurre con una gran parte de los electrodos sólidos. Se obtuvieron valores de  $C_{dl}$  para el nAu-GCE de  $0.7 \mu\text{F}$  y de  $6 \mu\text{F}$  ( $n=0.87$ ) para el biosensor de tirosinasa, mientras que para el electrodo de carbono vitrificado se obtuvo un valor CPE de  $4.2 \mu\text{F}$ .

Otro parámetro de especial interés es la *constante de transferencia electrónica*,  $k^0$ , que puede calcularse a partir de la medida de la resistencia a la transferencia de carga y del área del electrodo, empleando las siguientes expresiones,

$$R_{ct} = \frac{RT}{nFi_0} \quad \text{Ecuación [9]}$$

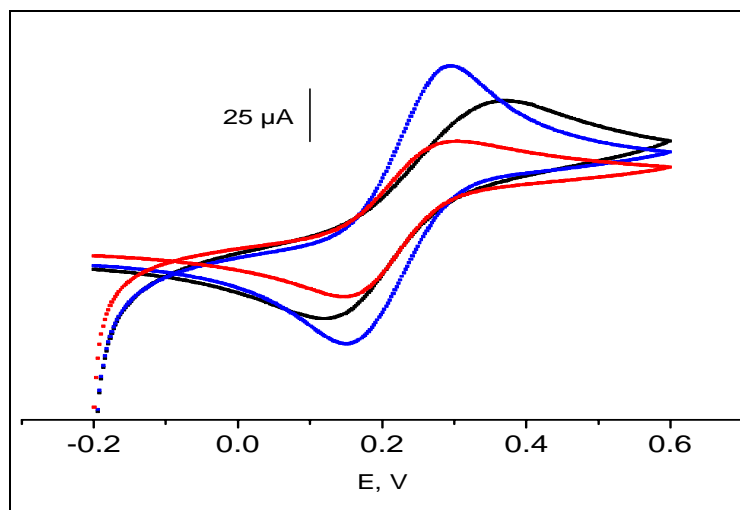
$$i_0 = nFAk^0 C^* \quad \text{Ecuación [10]}$$

donde  $A$  es la superficie del electrodo en  $\text{cm}^2$ ,  $C^*$  la concentración de la especie en  $\text{mol cm}^{-3}$ ,  $R_{ct}$  la resistencia a la transferencia de carga en  $\Omega$ ,  $i_0$  la corriente de intercambio en  $A$ ,  $R$  la constante de los gases ideales  $8.31 \text{ J/ K mol}$ ,  $T$  temperatura en grados Kelvin,  $n$  el número de electrones transferidos en la reacción y  $F$  la constante de Faraday  $96487 \text{ J/ K mol}$ .

A partir de los valores de  $R_{ct}$  mencionados anteriormente y aplicando las ecuaciones [9] y [10], se obtuvieron valores de la constante de transferencia electrónica de  $4.24 \times 10^{-4}$  y de  $2.89 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ , para una disolución de ferrocianuro/ferricianuro potásico  $5 \text{ mM}$  en  $\text{KCl } 1 \text{ M}$ , con el electrodo de carbono vitrificado sin modificar y con el electrodo modificado con las nanopartículas de oro electrodepositadas, respectivamente. Como era de esperar, el valor de dicha constante es aproximadamente 7 veces superior con el electrodo modificado, que en ausencia de las nanopartículas de oro, lo que

prueba la aceleración del proceso de transferencia de carga en la reacción electroquímica que implica el par redox ferrocianuro potásico/ ferricianuro potásico sobre un sustrato electródico modificado con nanopartículas de oro.

Las conclusiones extraídas mediante espectroscopia electroquímica de impedancia concuerdan cualitativamente con las observadas utilizando voltamperometría cíclica. En las *Figura 12* se recogen los voltamperogramas cíclicos correspondientes al electrodo de carbono vitrificado (GCE), al mismo electrodo modificado con nanopartículas de oro (nAu-GCE) y al biosensor de tirosinasa (Tir-nAu-GCE).



**Figura 12.-** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ ) sobre — GCE, — nAu-GCE y — Tir-nAu-GCE en  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mM en KCl 1 M.

Como puede observarse, la modificación del electrodo de GCE con nanopartículas de oro, produce un aumento notable de las corrientes de pico en el voltamperograma cíclico correspondiente, así como una disminución de la separación entre los potenciales de pico anódico y catódico, lo que nuevamente pone de manifiesto que la modificación con nanopartículas de oro da lugar a una mejor transferencia de carga. Con respecto al biosensor Tir-nAu-GCE, el voltamperograma obtenido muestra menores corrientes de pico, así como una menor reversibilidad que con el electrodo de carbono vitrificado modificado

con nanopartículas de oro. Sin embargo, aunque las corrientes de pico son semejantes a las observadas sobre un electrodo sin modificar, la separación entre los potenciales de pico anódico y catódico es menor que sobre GCE. Por tanto, nuevamente se deduce que el biosensor Tir-nAu-GCE presenta un comportamiento cinético intermedio entre el GCE y el mismo electrodo modificado con nanopartículas de oro (nAu-GCE).

El coeficiente de Warburg puede calcularse mediante extrapolación de la región lineal de bajas frecuencias del gráfico de Nyquist ( $Z' = R_s + R_{ct} - \sigma_W^2 C_{dl}$ ). Sin embargo, dado que la región circular en el caso del electrodo modificado con nanopartículas de oro es muy pequeña, se ha preferido determinar este parámetro a partir de la pendiente de la porción lineal que aparece a bajas frecuencias en la representación de  $Z'$  en función de  $f^{-1/2}$  (Figura 13). No fue posible calcular el coeficiente de Warburg para del biosensor de tirosinasa, ya que el gráfico de Nyquist no presenta un tramo lineal difusivo a .bajas frecuencias, siendo la pendiente obtenida, de 0.555, inferior a la unidad.

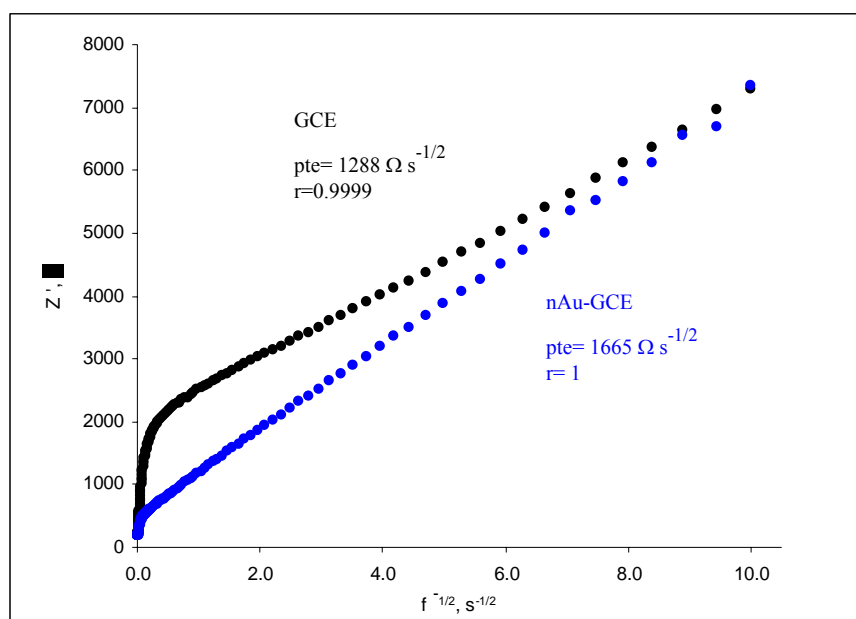


Figura 13.- Representaciones de la impedancia faradaica en función de  $f^{-1/2}$  para nAu-GCE y GCE.

A partir de los coeficientes de Warburg obtenidos para los electrodos nAu-GCE y GCE pueden calcularse los coeficientes de difusión para el par redox en cuestión. Como era de esperar, los valores de los coeficientes de difusión son, en ambos casos, del mismo orden,  $4.1 \times 10^{-7}$  y  $6.8 \times 10^{-7}$   $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ , respectivamente, dada la ausencia de enzima en ambas superficies.

### **III.1.1.2. Aspectos más relevantes del biosensor Tir-nAu-GCE**

La inmovilización de tirosinasa por entrecruzamiento sobre el electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de oro electrodepositadas ha permitido construir un biosensor con importantes características analíticas, como son, una buena repetibilidad de las medidas (R.S.D. =3.6%, n=6) sin necesidad de aplicar un pretratamiento de limpieza, una buena estabilidad en el tiempo (vida útil 35 días), así como una excelente sensibilidad para la determinación de compuestos fenólicos y una buena reproducibilidad en su fabricación (R.S.D.=4.8%, n=5). Además el empleo de este biosensor permite determinar de una manera rápida el contenido de compuestos fenólicos en vinos, empleando un procedimiento extremadamente simple.

Seguidamente se establece una comparación entre la sensibilidad del biosensor desarrollado con la conseguida empleando otras configuraciones de biosensores de tirosinasa que implican, bien la ausencia de nanopartículas de oro sobre la superficie electródica o bien el empleo de un electrodo de oro como sustrato.

En la *Tabla 6* se recogen los valores de las pendientes de los calibrados para catecol en un intervalo de concentración de  $1 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-5}$  M, obtenidos con cada uno de los diseños de biosensores, así como los procedimientos seguidos para la preparación de cada uno de ellos.

**Tabla 6.-** Comparación de las respuestas obtenidas con diferentes biosensores de Tirosinasa.

CONFIGURACIÓN ELECTRÓDICA	PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR	* PENDIENTE, $AM^{-1}$
Tir- nAu-GCE	1) Electrodep: E=-0.2 V t= 1min 2) 5 $\mu$ L de Tir de 91.3 U $\mu$ L <sup>-1</sup> 3) 30 min en GA	0.1022
Tir-GCE	1) 5 $\mu$ L de Tir de 91.3 U $\mu$ L <sup>-1</sup> 2) 30 min en GA	0.0012
Tir-AuE	1) 5 $\mu$ L de Tir de 91.3 U $\mu$ L <sup>-1</sup> 2) 30 min en GA	0.0568

\* Intervalo de concentración  $1 \times 10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-5}$  M catecol

Si se compara la sensibilidad obtenida con el biosensor de tirosinasa desarrollado con la del mismo dispositivo en ausencia del nanomaterial, se observa que la pendiente es dos órdenes de magnitud mayor en presencia de las nanopartículas de oro, y aproximadamente el doble que la obtenida cuando se inmoviliza la tirosinasa directamente sobre un electrodo de oro convencional. Este aumento de sensibilidad puede atribuirse a que las nanopartículas de oro distribuídas sobre la superficie del electrodo permite una mayor libertad de movimiento de la enzima inmovilizada debido a una cierta distancia entre ellas, mientras que la inmovilización directa sobre la superficie de un electrodo de oro convencional da lugar a que las moléculas de enzima estén más próximas entre sí, lo que confiere una mayor rigidez. Este último hecho es consistente con la disminución de sensibilidad (menor pendiente del calibrado del catecol) observada cuando se modifica la superficie del electrodo de carbono vitrificado empleando potenciales de electrodeposición más negativos, ya que, en estos casos, una mayor cantidad de oro electrodepositada se asemeja cada vez más a un electrodo de oro convencional.

Dada la importancia de la aplicación de los biosensores a la determinación de analitos de interés en muestras reales, el biosensor

desarrollado se ha utilizado para estimar el contenido total de polifenoles en vinos.

Esta estimación es de gran interés dada la correlación que existe entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles.

Tanto los vinos tintos como los blancos han sido analizados llevando a cabo el procedimiento descrito en el apartado II.1.3, que implica únicamente la adición de una alícuota de vino a la célula electroquímica y sucesivas adiciones de una disolución patrón de fenol aplicándose el método de adiciones estándar. El contenido de polifenoles ha sido expresado como  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cafeico [Campanella, 2004]. La estimación de estos compuestos ha de considerarse como un índice del contenido de polifenoles bioelectroquímico, debido a la diferente sensibilidad observada sobre el biosensor Tir-nAu-GCE para cada uno de los compuestos fenólicos.

Para validar la metodología puesta a punto empleando este biosensor, los resultados se han comparado con los obtenidos mediante el método espectrofométrico de Folin-Ciocalteu, que es el método recomendado para llevar a cabo una estimación del contenido total de polifenoles en este tipo de muestras. La preparación de las muestras y la realización del calibrado de ácido cafeico se han llevado a cabo tal como se describe en el apartado II.1.4.

Los resultados obtenidos por ambos métodos para las diferentes muestras se resumen en la *Tabla 7*. Estos valores se corresponden con el valor medio obtenido para 5 determinaciones de cada uno de los vinos, estando el intervalo de confianza definido para un nivel de significación de 0.05. Como puede apreciarse, los vinos tintos poseen un mayor contenido de polifenoles que los blancos, lo que, se debe principalmente al diferente proceso de obtención de ambos tipos de vino.

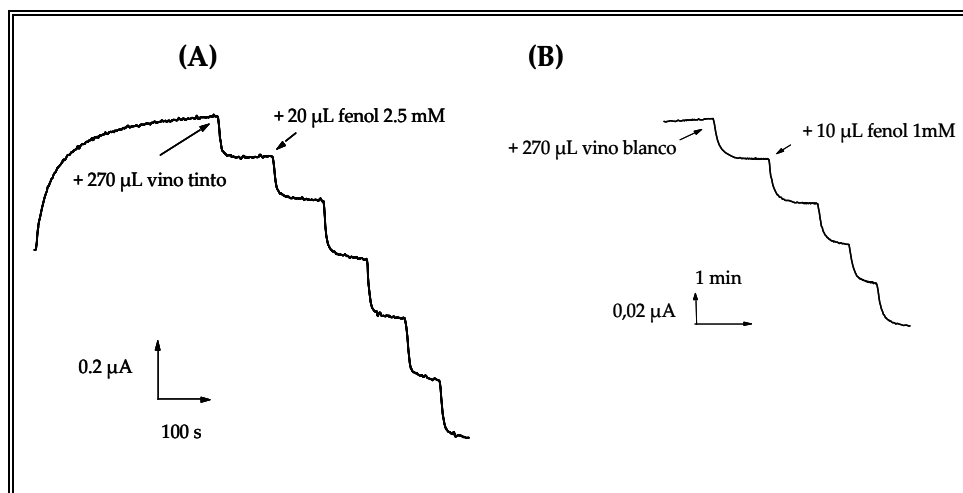
**Tabla 7.-** Estimación del contenido de compuestos polifenólicos en vinos empleando un biosensor de Tir-nAu-GCE

Vino	Biosensor*	Método Espectrofotométrico*
Blanco "Alvear"	18 ± 3	314 ± 15
Blanco "Señorío"	17 ± 1	325 ± 4
Blanco "Yuntero"	9.5 ± 0.2	209 ± 10
Blanco "Aranda"	6 ± 1	297 ± 27
Blanco "Sequeral"	12 ± 2	217 ± 13
Dulce	3.5 ± 0.5	77 ± 5
Tinto "Añadas"	47 ± 4	1790 ± 60
Tinto "Sotillo"	35 ± 2	1110 ± 80
Tinto "Blasón"	30.6 ± 0.6	1220 ± 20
Tinto "Sequeral"	40 ± 3	1340 ± 20

\*expresado como mg L<sup>-1</sup> de ácido cafeico

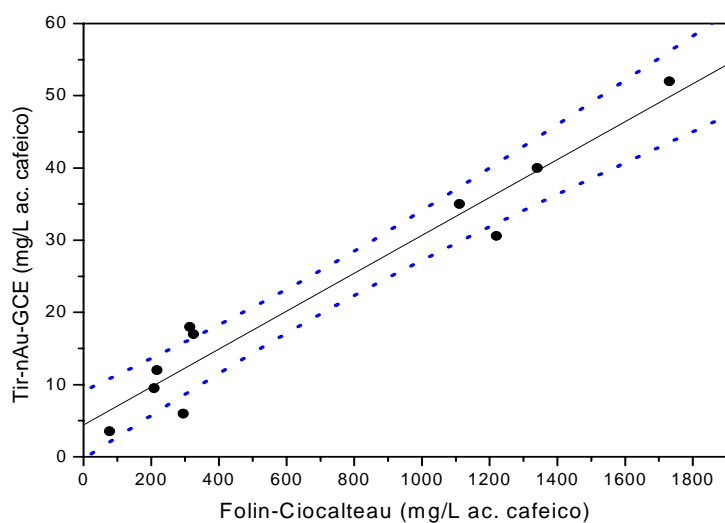
Como puede observarse, los resultados que proporcionan ambas metodologías son diferentes, lo que se debe a la distinta sensibilidad que presentan ambos métodos para la determinación de los diferentes compuestos polifenólicos. Mientras que el biosensor de tirosinasa está limitado a la determinación de compuestos fenólicos y catecoles con, al menos, una posición *orto* del anillo aromático libre, el método de Folin-Ciocalteu presenta el inconveniente de que el reactivo empleado puede reaccionar también con otros compuestos de naturaleza no polifenólica, que interfieren a la hora de llevar a cabo la determinación de polifenoles. Algunos de estos compuestos, como el ácido ascórbico y la glucosa, se encuentran presentes en el vino [Mello, 2003], por lo que se han ensayado como posibles interferentes con el biosensor de Tir-nAu-GCE, comprobándose que para las concentraciones medias esperadas no se observa respuesta alguna de corriente en las condiciones experimentales utilizadas.

A modo de ejemplo, en la *Figura 14*, se recogen los amperogramas correspondientes a dos de las muestras analizadas, una de vino tinto y otra de vino blanco, tras aplicar el método de adiciones estándar.



**Figura 14.-** Registros de intensidad-tiempo obtenidos con el biosensor Tir-nAu-GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4 (A) en una muestra de vino tinto "Sotillo", (B) en muestra de vino blanco Dulce por el método de las adiciones estándar.  $E_{ap.}$ : -0.1 V.

Asimismo, en la *Figura 15* se muestra la representación gráfica correspondiente a la correlación entre los resultados obtenidos para la estimación del contenido de los compuestos fenólicos por ambos métodos.



**Figura 15.-** Correlación entre los resultados obtenidos para la estimación el contenido de compuestos fenólicos en muestras de vino empleando el biosensor Tir-nAu-GCE y el método de Folin-Ciocalteu.

A pesar de la diferencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos, puede verse que se consigue una buena correlación entre ellos ( $r=0.990$ ), lo que pone de manifiesto la aplicabilidad del biosensor desarrollado para proporcionar una estimación de tipo electroquímico del contenido de polifenoles en vinos.

### **III.1.2. BIOSENSOR DE TIROSINASA BASADO EN UN ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

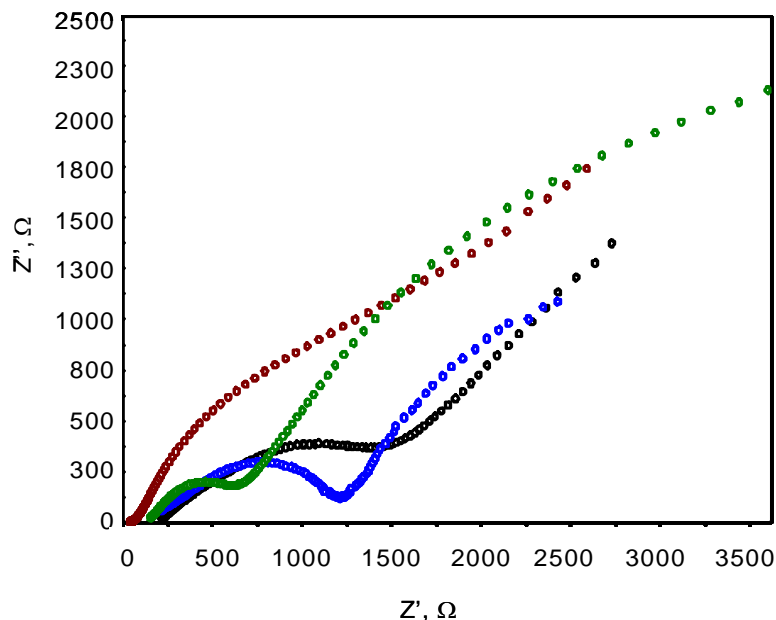
El empleo de electrodos compósitos ofrece importantes ventajas en comparación con los electrodos convencionales formados por una sola fase conductora. Los electrodos compósitos pueden fabricarse con una gran flexibilidad en lo que se refiere a su forma y tamaño; además presentan una mayor relación señal/ruido, lo que generalmente se traduce en una mejora de los límites de detección, constituyendo ésta una de las principales ventajas del empleo de estos materiales. Asimismo, al tratarse de una matriz tridimensional, es posible incorporar en el seno de la matriz por simple inclusión física otros componentes y sustancias, como nanopartículas de oro, enzimas, mediadores etc, que son capaces de mejorar la sensibilidad y/o la selectividad de las metodologías analíticas implicadas, y que permiten la regeneración de la superficie electródica por simple pulido.

Aprovechando estas ventajas se ha preparado por primera vez un biosensor compósito de tirosinas modificado con oro coloidal, capaz de estimar el contenido total de fenoles de una forma rápida y sencilla en aguas y alpechines.

#### ***III.1.2.1. Caracterización de la superficie electródica mediante técnicas electroquímicas***

Al igual que para el biosensor de carbono vitrificado, la superficie electródica se ha caracterizado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica. En la *Figura 16* se muestran los diagramas de Nyquist correspondientes a un electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro (Au<sub>col</sub>-GT) y sin modificar. Asimismo se muestran los

diagramas para biosensores de tirosinasa constituidos con electrodos modificados y sin modificar con las nanopartículas (Tir-Au<sub>col</sub>-GT y Tir-GT).



**Figura 16.-** Diagramas de Nyquist de (●) GT, (●) Au<sub>col</sub>-GT, (●) Tir-Au<sub>col</sub>-GT, (●) Tir-GT, en disolución  $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$  5mM en KCl 0.1 M.

En la *Tabla 8* se recogen los valores de la resistencia a la *transferencia de carga*,  $R_{ct}$ , calculados a partir del diámetro del semicírculo de los diagramas de Nyquist. Como puede observarse, el valor de dicha resistencia disminuye en presencia de nanopartículas de oro lo que pone de manifiesto, una vez más, que la modificación con oro coloidal facilita la transferencia electrónica.

En cuanto a los biosensores de tirosinasa, como era de esperar la resistencia a la transferencia de carga es mayor que en ausencia de enzima, lo que se atribuye al efecto bloqueante de la biomolécula inmovilizada sobre la superficie del electrodo. Asimismo, la resistencia a la transferencia de carga del biosensor compuesto preparado en ausencia del nanomaterial es superior al del mismo biosensor modificado con nanopartículas de oro.

**Tabla 8.-** Resultados obtenidos mediante EIS para un electrodo de GT, Au<sub>col</sub>-GT y los biosensores Tir-GT y Tir-Au<sub>col</sub>-GT

<b>ELECTRODO</b>	<b>R<sub>ct</sub>, Ω</b>	<b>k° cm/s</b>	<b>CPE, μF</b>	<b>n</b>
GT	4500 ± 600	1.69 × 10 <sup>-4</sup>	(580 ± 90)	(0.71 ± 0.06)
Au <sub>col</sub> -GT	790 ± 80	4.21 × 10 <sup>-4</sup>	(25 ± 7)	(0.71 ± 0.08)
Tir-GT	1500 ± 80		(128 ± 3)	(0.57 ± 0.06)
Tir-Au <sub>col</sub> -GT	1070 ± 90		(27 ± 3)	(0.63 ± 0.04)

Nivel de significación: 0.05

Como puede observarse en la *Figura 16*, en ningún caso llega a apreciarse a bajas frecuencias el tramo recto de pendiente unidad correspondiente a un control difusivo.

Por otra parte, se ha calculado la *constante de transferencia electrónica*, k°, a partir de la resistencia a la transferencia de carga medida en la región de altas frecuencias de los diagramas de Nyquist, haciendo uso de las ecuaciones [9] y [10]. En la *Tabla 8* se muestran los valores de k° obtenidos para los electrodos de grafito-Teflón y Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón, observándose como la presencia de las nanopartículas de oro favorecen la cinética de la transferencia electrónica obteniéndose un mayor valor de dicha constante.

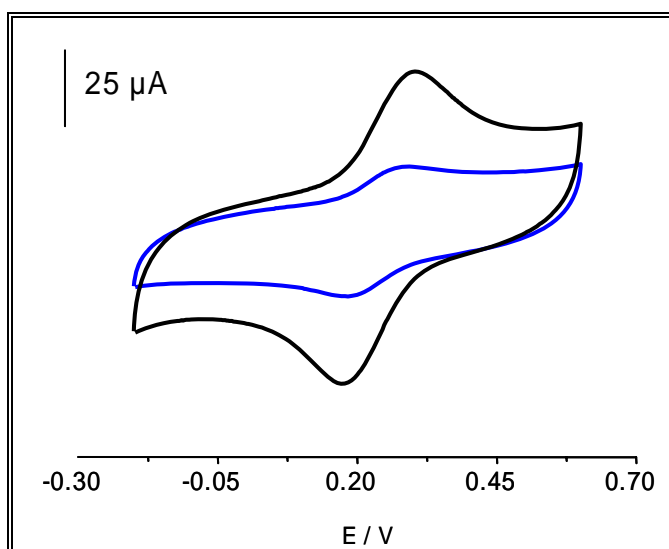
En cuanto a los valores de n obtenidos para los diferentes electrodos compósitos, en todos los casos dicho valor se aleja de la unidad, por lo que en el circuito de Randles debe tenerse un elemento de fase constante en lugar de un condensador. Como puede observarse en la *Tabla 8*, los valores de n para los biosensores de tirosinasa se alejan aún más de la unidad, aproximándose a 0.5 más que en el caso de los propios electrodos en ausencia de la enzima, lo que se atribuye a la presencia de la biomolécula en la superficie del electrodo [Katz, 2003].

El cálculo del área activa de los electrodos necesaria para el cálculo de la constante de transferencia electrónica, se realizó mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría siguiendo los procedimientos descritos en el apartado II.2.3. En la *Tabla 9* se muestran los valores obtenidos para ambos electrodos por las diferentes técnicas.

*Tabla 9.- Cálculo del área activa de los electrodos Au<sub>col</sub>-GT y GT.*

ELECTRODO	VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA (cm <sup>2</sup> )	CRONOAMPEROMETRÍA (cm <sup>2</sup> )
Au <sub>col</sub> -GT	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02
GT	0.0727 ± 0.007	0.070 ± 0.008

Como puede observarse, ambas técnicas proporcionan valores del área muy similares, obteniéndose, como era de esperar, un mayor valor del área activa en la superficie modificada con oro coloidal. A modo de ejemplo en la *Figura 17*, se muestran los voltamperogramas cíclicos realizados con ambos biosensores para una disolución de ferrocianuro potásico 5 × 10<sup>-4</sup> M en KCl 1 M.

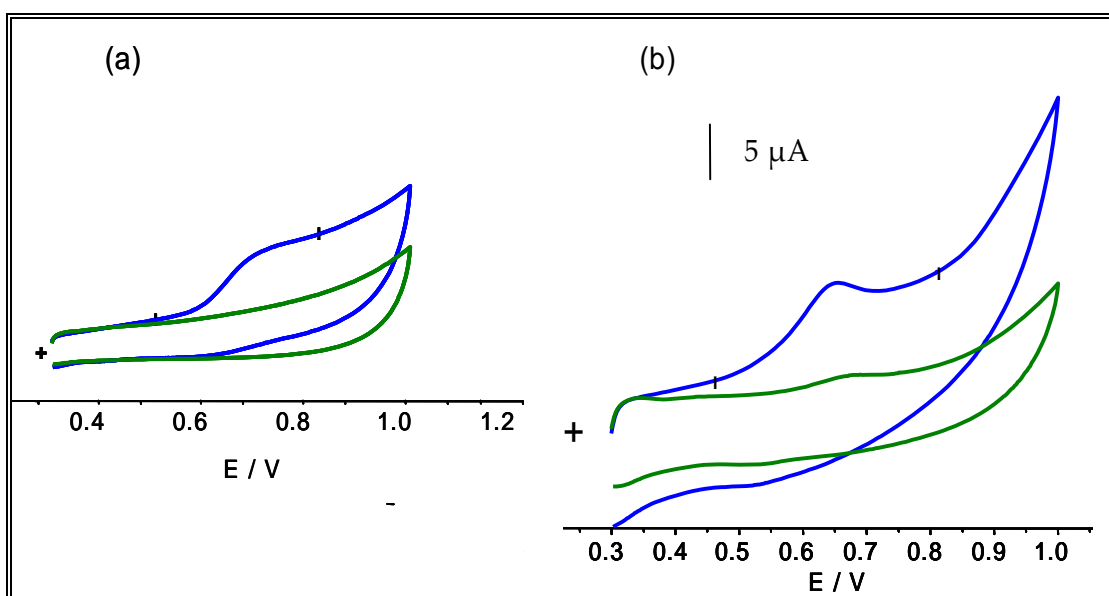


*Figura 17.- Voltamperogramas cíclicos de ferrocianuro potásico 5 × 10<sup>-4</sup> M en KCl 1 M a 0.3 V/ s. . (—) grafito-Teflón y (—) Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón.*

En los voltamperogramas cíclicos obtenidos se puede apreciar como la presencia de las nanopartículas de oro en la matriz produce un aumento en las intensidades de pico del voltamperograma correspondiente, lo que probablemente es debido a dicho aumento del área superficial activa.

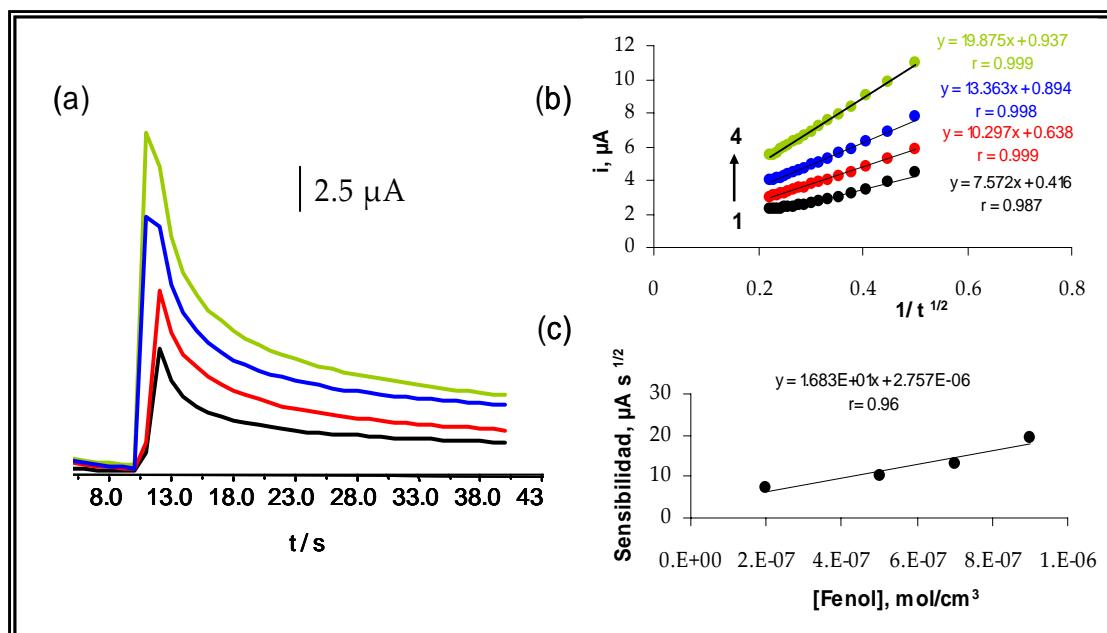
Se han calculado también los coeficientes de difusión y de transferencia electrónica para el fenol ( $\alpha$ ) sobre el electrodo compuesto de grafito-Teflón y sobre este electrodo modificado con nanopartículas de oro. Para ello se han empleado las técnicas de cronoamperometría y voltamperometría cíclica aplicando los procedimientos descritos en los apartados II.2.4 y II.2.5.

La técnica cronoamperométrica implica la aplicación de un salto de potencial desde un valor al cual no tiene lugar electrolisis ( $i=0$ ) hasta un valor al cual el proceso está controlado por difusión. La elección de dichos potenciales se realizó a partir del registro de los voltamperogramas cíclicos correspondientes, que se muestran en la *Figura 18* donde se han señalado dichos valores de potencial (0.5 y 0.8 V).

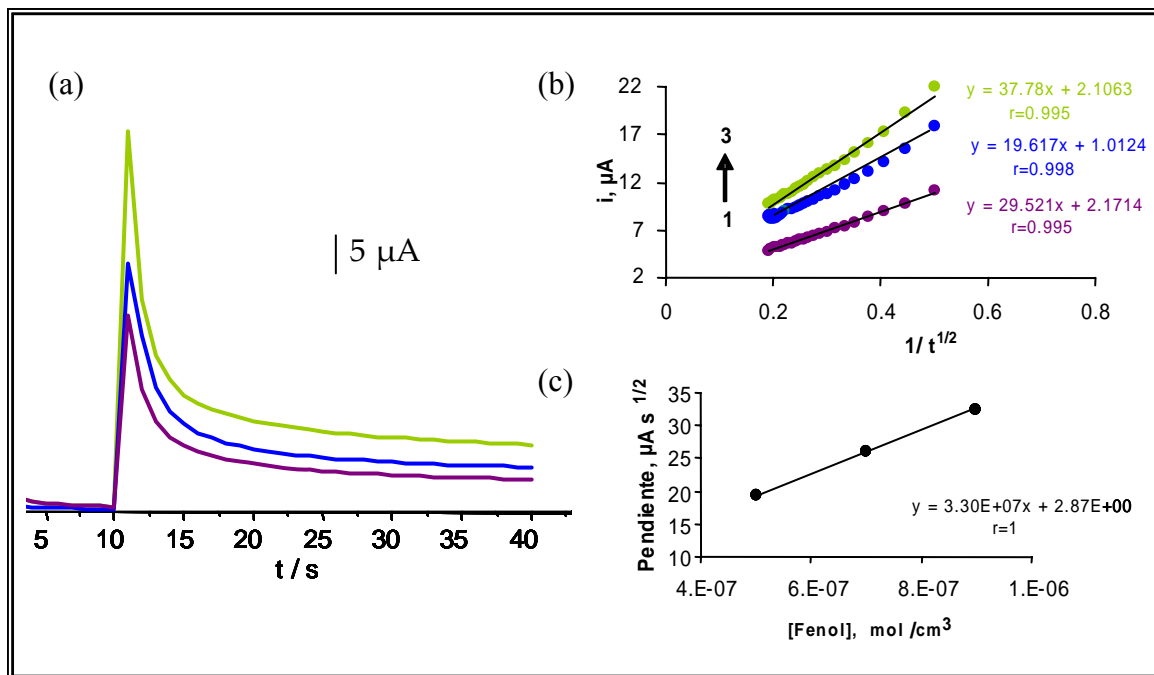


**Figura 18** – Voltamperogramas cíclicos para una disolución de fenol 0.5 mM (—) y una disolución de fondo (—). Medio TRIS 0.1 M a pH 7.0;  $v = 50$  mV/s (a) grafito-Teflón y (b) Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón.

En las Figuras 19 y 20 se recogen los cronoamperogramas correspondientes a disoluciones de fenol de diferente concentración empleando un electrodo de grafito-Teflón y Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón respectivamente. Asimismo, se muestran las representaciones de la corriente en función de la inversa de la raíz cuadrada del tiempo. Los coeficientes de difusión se han calculado a partir de la representación de las pendientes de las rectas anteriores en función de la concentración de fenol utilizando la ecuación de Cottrell [Zare, 2006].



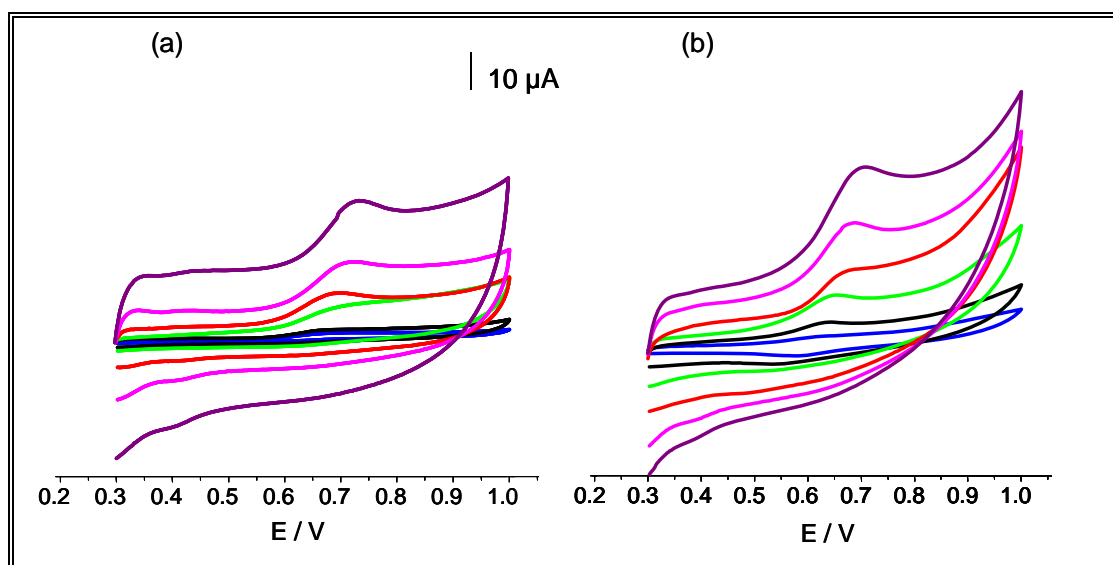
**Figura 19.-** (a) Respuesta cronoamperométrica del electrodo grafito-Teflón en medio regulador TRIS 0.1 M de pH 7.0 a 0.8 V para diferentes concentraciones de fenol. Los números 1-4 corresponden a fenol 0.2, 0.5, 0.7 y 0.9 mM. (b) Representación de  $i$  vs.  $1/t^{1/2}$  obtenidas a partir de los cronoamperogramas. (c) Representación de las pendientes vs. concentración de fenol.



**Figura 20.** (a) Respuesta cronoamperométrica del electrodo  $Au_{col}$ -grafito-Teflón en medio regulador TRIS 0.1 M de pH 7.0 a 0.8 V para diferentes concentraciones de fenol. Los números 1-3 corresponden a fenol 0.5, 0.7 y 0.9 mM. (b) Representación de  $i$  vs.  $1/t^{1/2}$  obtenidas a partir de los cronoamperogramas. (c) Representación de las pendientes vs. concentración de fenol.

Los valores de los coeficientes de difusión obtenidos han sido de  $2.95 \times 10^{-6}$  y de  $4.52 \times 10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  empleando el electrodo de grafito-Teflón y el electrodo modificado con nanopartículas de oro respectivamente. Los valores obtenidos con ambos electrodos son muy similares como era de esperar, dada la ausencia de recubrimientos de moléculas bloqueantes como enzimas, etc., que puedan dificultar el acceso del analito a la superficie del electrodo.

Se verificó la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre la intensidad y el potencial de pico obtenidos mediante voltamperometría cíclica con los electrodos de grafito-Teflón y grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro. En la *Figura 21* se muestran los voltamperogramas correspondientes.



**Figura 21.-** Voltamperogramas cíclicos obtenidos para una disolución de fenol  $5 \times 10^{-4}$  M en medio TRIS 0.1 M de pH 7.0 sobre un electrodo de grafito-Teflón (a) y  $Au_{col}$ -grafito-Teflón (b) a diferentes velocidades de barrido, — 5, — 20, — 50, — 100, — 200, — 300 mV/s.

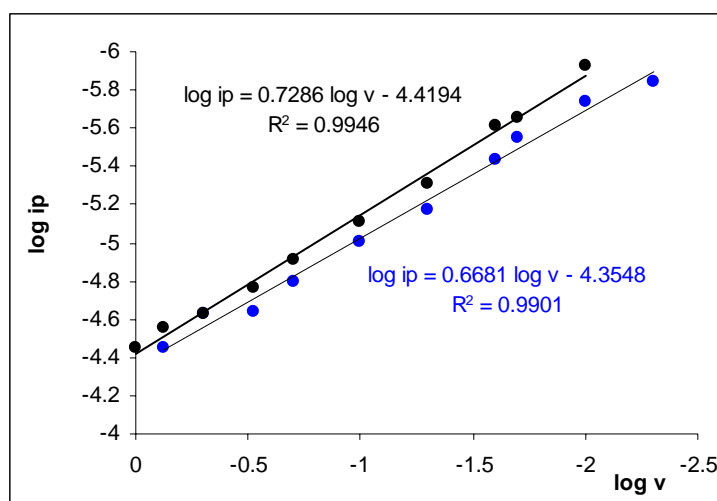
Los valores de la intensidad de corriente de pico y de los potenciales de pico para una disolución de fenol  $5 \times 10^{-4}$  M se recogen en la *Tabla 10*.

**Tabla 10.-** Influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre la intensidad y el potencial de pico para fenol  $5 \times 10^{-4}$  M empleando un electrodo de grafito-Teflón y un electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro.

$v$ , mV/s	$i_p$ , $\mu A$		$E_p$ , mV	
	GT	$Au_{col}$ -GT	GT	$Au_{col}$ -GT
10	1.18	1.81	674	620
20	2.23	2.79	691	630
25	2.43	3.66	693	632
50	4.86	6.69	682	644
100	7.85	9.92	700	671
200	12.2	16.1	724	674
300	17.1	20.9	735	693
500	23.4	23.7	739	720
750	27.7	35.2	741	744

Como puede observarse, el potencial de pico aumenta ligeramente a medida que aumenta la velocidad de barrido de potencial utilizando ambas superficies electródicas, siendo estos valores siempre ligeramente menos positivos con el electrodo nanoestructurado que los correspondientes al electrodo de grafito-Teflón.

En cuanto a la intensidad de corriente, se aprecia un aumento de su valor con la velocidad de barrido con ambos electrodos, siendo la magnitud de dicha corriente mayor en el caso del electrodo modificado con nanopartículas de oro, dado el conocido efecto catalítico que ejercen las nanopartículas del metal. En la *Figura 22* se muestran las representaciones del logaritmo de la intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido para ambas superficies electródicas, observándose en ambos casos una línea recta, de pendiente comprendida entre 0.5 y 1.0, lo que indica que se trata de un sistema que no está totalmente controlado por difusión, sino que presenta una cierta contribución de adsorción [Xiao, 2008].



*Figura 22.-* Representación del logaritmo de la intensidad de pico vs. logaritmo de la velocidad de barrido para una disolución de fenol  $5 \times 10^{-4}$  M en TRIS 0.1 M de pH 7.0, empleando un electrodo de grafito-Teflón (—) y Au-col-grafito-Teflón (—).

A partir del cálculo de las pendientes de Tafel, se ha obtenido el parámetro  $\alpha_{na}$  para el fenol sobre ambos tipos de electrodos. Las pendientes de Tafel se obtuvieron representando el logaritmo de la corriente frente al potencial a diferentes velocidades de barrido, midiendo en la región del voltamperograma en la que la intensidad es inferior al 10% de la corriente de pico, zona en la que la respuesta está afectada únicamente por la cinética de transferencia electrónica entre la especie electroactiva y la superficie del electrodo [Banks, 2005]. Para ello, es necesario la eliminación de la contribución del electrolito soporte por extrapolación lineal de la respuesta obtenida a potenciales previos a la oxidación del fenol. De esta forma, los valores medios ( $n=10$ ) de  $\alpha_{na}$  empleando un electrodo de grafito-Teflón y grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro han sido de 0.43 y 0.48 respectivamente. Estos valores ponen de manifiesto que el número de electrones intercambiados en la etapa limitante de la velocidad es la unidad, siendo estos resultados consistentes con los obtenidos por otros autores empleando otros materiales electródicos [Hart, 1997].

### **III.1.2.2. Aspectos más relevantes del biosensor Tir-Au<sub>col</sub>-GT**

Las ventajas de combinar el empleo de una matriz compósita como es la de grafito-Teflón para la inmovilización de enzimas y la incorporación de nanopartículas de oro en dicha matriz tridimensional, ha permitido el desarrollo de un biosensor de tirosinasa con características analíticas que mejoran las obtenidas con otros biosensores de tirosinasa ya existentes. Por otra parte, la regeneración de la superficie del biosensor y por tanto de su actividad, mediante un simple pulido, junto con las ventajas que proporcionan las nanopartículas de oro reteniendo la actividad biológica de la proteína, ha permitido construir un biosensor reutilizable y reproducible con una alta estabilidad y tiempo de vida útil.

A modo de comparación, en la *Tabla 11* se recogen las características analíticas obtenidas con distintos biosensores electroquímicos de tirosinasa encontrados en la bibliografía, incluyendo las proporcionadas por el biosensor compuesto Tir-Au<sub>col</sub>-GT desarrollado en esta Memoria.

**Tabla 11.-** Características analíticas de diferentes biosensores electroquímicos de tirosinasa utilizando fenol como sustrato.

<i>Electrodo</i>	<i>Sensibilidad*</i>	<i>LD, μM</i>	<i>K<sub>M</sub><sup>app</sup>, M</i>	<i>Tiempo de vida útil</i>	<i>Ref.</i>
<i>Tir-PEDT-GCE</i>	608 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	0.05		Retiene 30% de la actividad después de 12 días	[Verdine,2003]
<i>Tir-sol-gel-TiO<sub>2</sub></i>	103 mA M <sup>-1</sup>	0.1	2.9 x 10 <sup>-4</sup>	Retiene 94% de la actividad después de 80 días	[Yu, 2003]
<i>Tir-sol-gel-SiO<sub>2</sub></i>	23.1 mA M <sup>-1</sup>	0.1		Retiene 73% de la actividad después de 3 semanas	[Wang, 2000]
<i>Tir-MPA-AuE</i>	13.9 mA M <sup>-1</sup>	0.088	1.5 x 10 <sup>-4</sup>	5 días	[Campuzano, 2003]
<i>Tir/GDH-Clark</i>	6.6 mA M <sup>-1</sup>	0.01			[Streffler, 2001]
<i>Tir-RVC</i>	8.2 mA M <sup>-1</sup>	0.26		20 días	[Peña, 2001]
<i>Tir-HRP-SPCE</i>	1300 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> 62.3 mA M <sup>-1</sup>	0.0025		Retiene 92% de la actividad después de 60 días	[Chang, 2002]
<i>Tir-GT</i>	280 mA M <sup>-1</sup>	0.09	7.76 x 10 <sup>-5</sup>	30 días	[Serra, 2002]
<i>Tir-C-epoxy</i>	0.794 mA M <sup>-1</sup>	1.0		30 días	[Önnerfjord 1995]
<i>Tir-CPE</i>	0.810 mA M <sup>-1</sup>	15			[Wang, 1994]
<i>Tir-Au<sub>col</sub>-CPE</i>	23 mA M <sup>-1</sup>	0.0061	5.36 x 10 <sup>-5</sup>	2 semanas	[Liu, 2003c]
<i>Tir-nAu-GCE</i>	82 mA M <sup>-1</sup>	0.21	1.4 x 10 <sup>-4</sup>	18 días	[Carralero-Sanz, 2005]
<i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	540 mA M <sup>-1</sup> 7643 mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	0.02	8.9 x 10 <sup>-6</sup>	39 días	Este trabajo

\*Expresada como pendiente del calibrado; GCE: electrodo de carbono vitrificado; PEDT: poli(3,4-etilendioxitifeno); MPA: ácido 3-mercaptopropionico; GDH. Glucosa deshidrogenasa; RVC: carbono vítreo reticulado; SPCE: electrodo de carbono serigrafado; CPE: electrodo de pasta de carbono; GT: grafito-Teflón.

Es de destacar como el biosensor de Tir-Au<sub>col</sub>-GT permite conseguir una mejora significativa en la sensibilidad para la detección del fenol, tal y como se deduce del valor obtenido para la pendiente del calibrado de dicho compuesto, que es, como mínimo, un orden de magnitud más elevada que las reportadas para otros biosensores de tirosinasa. Es interesante señalar que el segundo biosensor más sensible es el de Tir-GT. Si se comparan estas configuraciones electrónicas más sensibles, puede deducirse que la presencia del oro coloidal en la matriz compósita es el responsable del marcado incremento que se produce en la sensibilidad.

En cuanto al límite de detección, sólo dos de los biosensores recogidos en la Tabla poseen un valor algo inferior al obtenido con el electrodo Tir-Au<sub>col</sub>-GT desarrollado, a pesar de poseer ambos una sensibilidad muy inferior (62.3 y 23 mA M<sup>-1</sup> frente a 540 mA M<sup>-1</sup>).

Por otra parte, si se comparan los valores de la constante aparente de Michaelis-Menten calculados para cada uno de los biosensores de tirosinasa recogidos en la *Tabla*, el obtenido con el biosensor Tir-Au<sub>col</sub>-GT es aproximadamente un orden de magnitud menor que los calculados para otras configuraciones, lo que indica una mayor afinidad de la enzima por el sustrato utilizando esta configuración y, por tanto, una mayor sensibilidad. Este hecho pone de manifiesto la existencia de una mayor cantidad de enzima activa inmovilizada sobre la superficie electrónica, como consecuencia de la mejor inmovilización de la biomolécula sobre las nanopartículas de oro.

Otro parámetro de gran relevancia que aparece reflejado en la *Tabla 11*, es el tiempo de vida útil del biosensor. Como puede observarse, el tiempo de vida de los distintos biosensores que aparecen en la *Tabla* varía mucho de unas configuraciones a otras, siendo el biosensor de Tir-Au<sub>col</sub>-GT uno de los que

mayor tiempo de vida útil presenta. Esto puede atribuirse, por una parte, a la posibilidad de regenerar la superficie electródica por simple pulido y, por otra, a la incorporación de las nanopartículas de oro a la matriz tridimensional que mejora la inmovilización de la enzima reteniendo su actividad biológica [Pan, 2003].

Con el fin de verificar el efecto catalítico que ejercen las nanopartículas de oro en la respuesta del biosensor, se han comparado las medidas de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidas empleando el biosensor compuesto desarrollado (Tir-Au<sub>col</sub>-GT), con las correspondientes al biosensor preparado de forma análoga pero en ausencia del nanomaterial [Serra, 2002]. En la *Tabla 12* se muestran los resultados obtenidos para tres de los compuestos fenólicos estudiados con ambos biosensores.

**Tabla 12.-** Características analíticas obtenidas para diferentes compuestos fenólicos con los biosensores compósitos de Tirosinasa en presencia y ausencia de oro coloidal.

<i>Biosensor</i>	<i>Intervalo Lineal (μM)</i>	<i>Sensibilidad (mA/M)</i>	<i>Límite de Detección (μM)</i>
Fenol			
<i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	0.025-4.0	540	0.02
<i>Tir-GT</i>	0.1-25	280	0.099
3,4-Dimetilfenol			
<i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	0.05-2.0	563	0.011
<i>Tir-GT</i>	0.1-6	520	0.1
4-Cloro-2-Metilfenol			
<i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	10-275	9	3.3
<i>Tir-GT</i>	50-100	3	23

Como puede apreciarse, la modificación del biosensor compuesto con las nanopartículas de oro mejora las características analíticas alcanzadas con el

biosensor de Tir-GT, consiguiéndose una mayor *sensibilidad* y menores *límites de detección* para la determinación de los diferentes compuestos fenólicos.

Una vez comprobado el efecto catalítico de las nanopartículas de oro y con el fin de conocer si la catálisis afecta a la reacción electroquímica de reducción de la quinona en la superficie electródica y/o a la reacción enzimática de oxidación del catecol a quinona, se han realizado medidas de la intensidad de corriente en estado estacionario para una disolución de 2,4-benzoquinona 5  $\mu\text{M}$  empleando un electrodo de grafito-Teflón en presencia y en ausencia de nanopartículas de oro. Asimismo, se han realizado medidas correspondientes a disoluciones de fenol de concentración 5  $\mu\text{M}$  empleando un biosensor de grafito-Teflón modificado con oro coloidal y sobre otro en ausencia de las nanopartículas metálicas. En la *Tabla 13* se recogen los valores obtenidos para las intensidades en cada caso.

**Tabla 13.-** Efecto de la presencia de nanopartículas de oro sobre la intensidad de corriente de 2,4- benzoquinona y fenol.

<i>ELECTRODO</i>	<i>2,4-BENZOQUINONA 5<math>\mu\text{M}</math>, <math>\mu\text{A}</math></i>	<i>FENOL 5 <math>\mu\text{M}</math>, <math>\mu\text{A}</math></i>
GT	(0.0464 $\pm$ 0.002)	-
Au <sub>col</sub> -GT	(0.106 $\pm$ 0.008)	-
Tir-GT	-	(0.94 $\pm$ 0.10)
Tir-Au <sub>col</sub> -GT	-	(2.1 $\pm$ 0.3)

Como puede observarse, la intensidad de corriente en presencia de oro coloidal es superior a la obtenida en ausencia del nanomaterial, tanto para el electrodo de grafito-Teflón como con el biosensor de tirosinasa. La respuesta del biosensor es aproximadamente 2.5 veces mayor con el biosensor que contiene las nanopartículas de oro que con el que no las contiene. Estos resultados permiten deducir que la presencia de oro coloidal en la matriz compósita de grafito-Teflón es responsable del aumento tanto de la cinética de la reacción

enzimática de los sustratos fenólicos, como de la cinética de la reacción de reducción electroquímica de la correspondiente *o*-quinona [Liu Y., 2003].

En cuanto a la aplicación del biosensor desarrollado al análisis de muestras reales, la sencillez en el procedimiento de medida y el poco tiempo requerido para el análisis ha permitido la determinación de compuestos fenólicos en distintos tipos de aguas, así como en muestras de alpechín. En ambos casos, los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por otros métodos analíticos de uso común.

Con el fin de comprobar si la metodología desarrollada podía ser utilizada para proporcionar la información necesaria acerca del contenido de compuestos fenólicos, se analizaron varias muestras de agua de diferentes características. La primera de ellas consistió en una muestra sintética preparada en el laboratorio, que fue enriquecida con tres compuestos fenólicos diferentes, fenol en concentración 1  $\mu\text{M}$ , 3,4-dimetilfenol 2.5  $\mu\text{M}$  y 4-cloro-2-metilfenol 1  $\mu\text{M}$ . Estos compuestos se eligieron debido a la distinta sensibilidad con la que son detectados con el biosensor de tirosinasa, y por su diferente polaridad. Las otras tres muestras de agua analizadas proceden de una refinería y han sido tomadas en diferentes días y en distintas etapas del proceso de purificación. El procedimiento llevado a cabo para la determinación amperométrica del contenido fenólico se describe en el apartado II.2.6, aplicándose el método de adiciones estándar y expresándose el índice fenólico como mol/L de fenol.

Los resultados correspondientes a las diferentes muestras se compararon con los obtenidos al aplicar el método espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina. En la *Tabla 14* puede observarse como el índice de fenoles obtenido por ambos métodos para una misma muestra proporciona un valor numérico diferente, lo que se debe a la diferente sensibilidad que presentan

estos métodos hacia los diferentes compuestos fenólicos. En el caso del método espectrofotométrico, la diferencia en la respuesta se debe a que la estructura del compuesto fenólico influye en la interacción con la 4-aminoantipirina. Así, por ejemplo, compuestos fenólicos sustituidos en posición para- como 3,4-dimetilfenol y 4-cloro-2-metilfenol, no dan prácticamente respuesta, por tener impedida la posición más activa para la interacción con el reactivo derivatizante. Tampoco reaccionan los fenoles muy desactivados como los cloro- o nitrofenoles muy sustituidos. Este hecho puede explicar la baja concentración de fenol obtenida por el método espectrofotométrico para las muestras que contienen estos compuestos. Por otro lado, las muestras que contienen compuestos fenólicos con la posición orto- sustituida presentan una menor sensibilidad cuando se emplea el biosensor, debido, como se ha comentado anteriormente, a que la enzima tirosinasa no responde a los compuestos fenólicos que presentan ocupada la posición orto-.

**Tabla 14.-** Estimación del contenido de compuestos fenólicos en muestras de aguas procedentes de una refinería.

<b>MUESTRA</b>	<b><i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i></b> <b><i>(mol L<sup>-1</sup> fenol)</i></b>	<b><i>Método espectrofotométrico</i></b> <b><i>4-aminoantipirina (mol L<sup>-1</sup> fenol)</i></b>
<i>Enriquecida</i>	$(3.9 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-6}$
<i>M1</i>	$(10 \pm 2) \times 10^{-6}$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$
<i>M2</i>	$(6 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(1.20 \pm 0.04) \times 10^{-6}$
<i>M3</i>	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$

A pesar de las diferencias en los valores numéricos que se obtienen por ambos métodos, se observa una buena correlación ( $r^2=0.9997$ ) entre ambas metodologías cuando se representan dichos valores, lo que pone de manifiesto la aplicabilidad del biosensor desarrollado para la estimación del contenido

fenólico en este tipo de muestras, con la ventaja adicional de un tiempo de análisis considerablemente menor respecto al método espectrofotométrico.

Como ya se ha comentado, el biosensor compuesto se ha aplicado a la determinación del contenido total de fenoles en muestras de *alpechín*. El alpechín es un líquido negrozco originado en las almazaras como subproducto en la obtención del aceite de oliva, que se caracteriza por ser altamente contaminante debido al elevado contenido de materia orgánica (polifenoles entre otros compuestos) y a la gran cantidad de sustancias disueltas que posee. Su degradación en la naturaleza o en plantas depuradoras es difícil, por lo que su efecto medioambiental puede ser muy dañino. Al tratarse de un producto natural, su composición no es constante, variando según el tipo de aceituna, la estación, tipo de recogida y sobre todo con el proceso industrial empleado en la obtención del aceite.

Con respecto a las muestras analizadas, las denominadas Martos 2 y Martos 2 a, b y c proceden de una almazara en la que la obtención de aceite de oliva se realiza empleando un sistema por presión, siendo el contenido de compuestos fenólicos superior que en las muestras resultantes del empleo de un sistema por centrifugación. El resto de las muestras, Martos 1, Almendralejo (Badajoz) y Villarejo de Salvanes (Madrid), proceden de un sistema de extracción por centrifugación, de dos fases en la primera y de tres fases en las dos últimas muestras.

En la *Tabla 15* se muestra la estimación del contenido fenólico de estas muestras empleando el biosensor compuesto de tirosinasa desarrollado. Asimismo, se muestran los resultados obtenidos con un biosensor de lacasa preparado en el laboratorio [Mena, 2005b], así como los proporcionados por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. En todos los casos el

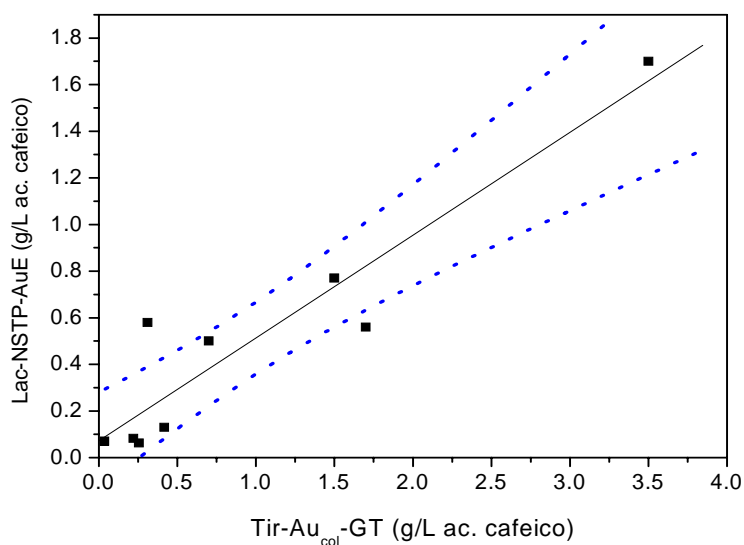
contenido fenólico se expresa como g/L de ácido cafeico. Cada uno de los valores corresponden al valor medio de 5 determinaciones de cada una de las muestras, indicándose el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05.

**Tabla 15.-** Estimación del contenido de compuestos fenólicos en alpechín

MUESTRA	BIOSENSOR (g L <sup>-1</sup> ác. Cafeico)		MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO FOLIN- CIOCALTEAU (g L <sup>-1</sup> ác. Cafeico)
	<i>Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	<i>Lac-NSTP-AuE</i>	
<i>Badajoz</i>	0.255 ± 0.002	0.063 ± 0.008	0.270±0.009
<i>Martos 1</i>	0.416 ± 0.002	0.13 ± 0.01	0.352 ± 0.005
<i>Martos 2</i>	3.5 ± 0.7	1.7 ± 0.2	7.2 ± 0.5
<i>Villarejo</i>	0.22 ± 0.03	0.083±0.005	0.58 ± 0.02
<i>Martos 2a</i>	1.5 ± 0.1	0.77 ± 0.04	3.6 ± 0.2
<i>Martos 2b</i>	1.7 ± 0.3	0.56 ± 0.07	2.4 ± 0.2
<i>Martos 2c</i>	0.7 ± 0.1	0.50 ± 0.03	1.8 ± 0.1

El empleo del biosensor de tirosinasa desarrollado implica la medida de la corriente tras adicionar una alícuota de la muestra a 10 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 aplicando un potencial de medida de -0.1 V. En el caso del biosensor de lacasa se empleó regulador citrato 0.1 M de pH 5.0 aplicándose un potencial de 0.0 V [Mena, 2005b]. En ambos casos se aplicó el método de adiciones estándar.

En la *Figura 23* se muestra la representación gráfica correspondiente a los resultados obtenidos utilizando ambos biosensores.

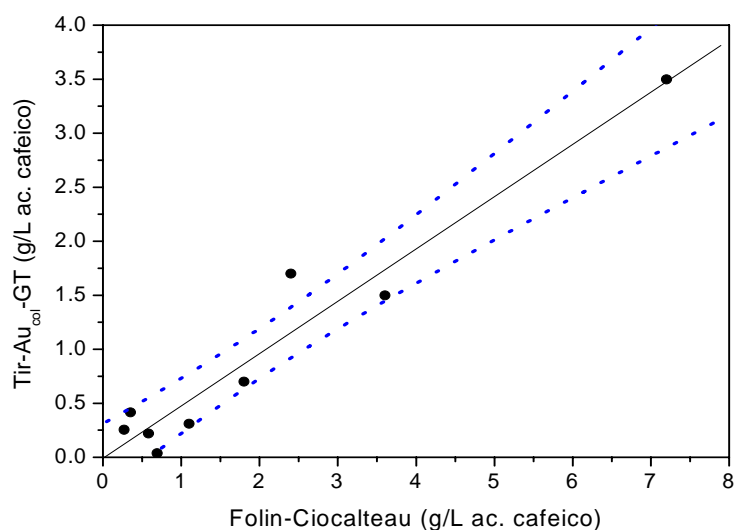


**Figura 23.-** Correlación entre los resultados obtenidos para la estimación del contenido de compuestos fenólicos en muestras de alpechín empleando los biosensores de Tir-Au<sub>col</sub>-GT y de Lac-NSTP-AuE.

Se observa una correlación aceptable empleando ambos tipos de biosensores, obteniéndose una ordenada en el origen que incluye el cero, lo que indica la no existencia de errores sistemáticos. Sin embargo, el valor de la pendiente,  $0.44 \pm 0.04$ , difiere significativamente de la unidad. Esto se debe principalmente a la distinta sensibilidad que presentan los biosensores enzimáticos empleados, por los diferentes compuestos fenólicos. De hecho, hay que tener en cuenta que la Tirosinasa presenta una especificidad limitada a compuestos monofenólicos y catecoles con una posición orto- del anillo aromático libre o bien ocupada por un grupo -OH. Además, no muestra actividad para la oxidación de los para- y los meta- bencenodiolos ni sus derivados sustituidos, ni para los clorofenoles multisustituidos y nitrofenoles. Sin embargo, el biosensor de Lacasa presenta una mayor sensibilidad para compuestos fenólicos sustituidos por grupos dadores de electrones y grupos con dobles enlaces conjugados como es el caso del ácido cafeico. Este hecho

justifica el valor de la pendiente obtenida cuando se comparan los resultados obtenidos con ambos biosensores.

Por otra parte en la *Figura 24* se representan los valores obtenidos con el biosensor compuesto de tirosinasa desarrollado frente a los resultados proporcionados por el método de Folin-Ciocalteu.



*Figura 24.-* Correlación entre los resultados obtenidos para la estimación del contenido de compuestos fenólicos en muestras de alpechín empleando el biosensor *Tir-Au<sub>col</sub>-GT* y el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu.

Como puede observarse, no existen errores sistemáticos dado que la ordenada de la recta pasa por el origen de coordenadas. En cuanto a la pendiente, su valor diferente de la unidad ( $0.54 \pm 0.09$ ) es, de nuevo, consecuencia de la distinta sensibilidad existente entre ambas metodologías.

Finalmente cabe destacar la buena correlación ( $r=0.996$ ) entre el biosensor de tirosinasa y el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, lo que pone de manifiesto la aplicabilidad del método desarrollado.

### **III.1.3. COMPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES *Tir-nAu-GCE* Y *Tir-Au col-GT***

En esta Memoria se han preparado dos biosensores basados en la enzima tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en diferentes tipos de muestras. Como ya se ha comentado, en cada uno de ellos se ha empleado un procedimiento diferente de inmovilización de las nanopartículas de oro dependiendo de la matriz electródica empleada, que presentan algunas ventajas así como también algunos inconvenientes.

En cuanto al biosensor de tirosinasa que utiliza un electrodo de carbono vitrificado, la incorporación de las nanopartículas de oro en la superficie electródica se ha llevado a cabo mediante electrodeposición. Este procedimiento de modificación de la superficie con el nanomaterial resulta ser bastante simple y rápido, comparado con otros procedimientos que requieren la preparación de una disolución de oro coloidal, en los que las nanopartículas metálicas forman parte de la matriz electródica o bien se adsorben sobre su superficie tras sumergir el electrodo durante un periodo de tiempo, siempre superior al necesario en la electrodeposición. Una de las principales ventajas que presenta este procedimiento de modificación es que basta con fijar el potencial y el tiempo necesario de aplicación para controlar el tamaño deseado de las nanopartículas, obteniéndose resultados muy reproducibles. La principal desventaja frente al biosensor de tirosinasa basado en la inclusión de las nanopartículas de oro junto con la enzima en el interior de la matriz electródica es un menor tiempo de vida útil, además de no existir la posibilidad de regenerar la superficie electródica por simple pulido.

A continuación se comparan las características analíticas para la detección de dos compuestos fenólico, fenol y catecol, empleando los dos

biosensores desarrollados en esta Memoria. La elección de estos dos compuestos se debe a que son los más empleados en la realización de los diferentes estudios de optimización. En la *Tabla 16* se recogen el intervalo lineal, la pendiente del calibrado, así como los límites de detección obtenidos en cada caso.

**Tabla 16-.** Comparación de las características analíticas para la detección amperométrica de fenol y de catecol empleando los biosensores desarrollados.

ELECTRODO	Tir-nAu-GCE	Tir-Au <sub>col</sub> -GT
<i>Fenol</i>		
Intervalo lineal, $\mu\text{M}$	1 – 40	0.025 - 4.0
Sensibilidad, A/ M	0.082	0.540
Límite de detección, $\mu\text{M}$	0.21	0.020
<i>Catecol</i>		
Intervalo lineal, $\mu\text{M}$	0.5 – 50	0.010 - 8.0
Sensibilidad, A/ M	0.107	0.746
Límite de detección, $\mu\text{M}$	0.15	0.003

Los resultados obtenidos, tanto para el fenol como para el catecol, empleando el biosensor compuesto revelan una mayor sensibilidad que la obtenida con el biosensor basado en el electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas electrodepositadas. Esta alta sensibilidad se debe fundamentalmente a dos factores. Por un lado, a la rápida cinética de la reacción enzimática, obteniéndose con el biosensor compuesto valores de la constante de Michaelis-Menten un orden de magnitud menor que con el biosensor que emplea el electrodo de carbono vitrificado. Esta cinética enzimática más rápida lo es también cuando se compara el biosensor

compósito, con otros diseños de biosensores encontrados en la bibliografía, como ya se ha comentado. Por otro lado, la presencia del oro coloidal en la matriz compósita aumenta también la cinética de la reacción de reducción electroquímica de la correspondiente *o*-quinona. En cuanto a los límites de detección obtenidos con el biosensor compósito éstos son, como mínimo, un orden de magnitud inferior que los alcanzados con el biosensor basado en el empleo del electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas electrodepositadas.

Finalmente destacar que ambos biosensores presentan una elevada estabilidad operacional, así como proporcionan una excelente repetibilidad de las medidas y una elevada reproducibilidad en su fabricación.

Todas estas características operacionales favorables han permitido aplicar ambos biosensores a la determinación de compuestos fenólicos en muestras reales con resultados satisfactorios.

### **III.2. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES BASADOS EN SUPERFICIES COMPÓSITAS NANOESTRUCTURADAS**

El empleo de inmunosensores electroquímicos como herramienta analítica constituye una excelente alternativa para el análisis de alimentos, clínico y medioambiental. El empleo de anticuerpos proporciona la especificidad necesaria para este tipo de análisis, mientras que el procedimiento de medida electroquímica permite una alta sensibilidad en la detección y un bajo coste de la instrumentación y en la fabricación de los biosensores.

En este trabajo se ha hecho uso de un electrodo compuesto de grafito y Teflón estructurado con nanopartículas de oro, Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón, como matriz electródica para la preparación de diferentes inmunosensores. De esta forma se combinan las ventajas conocidas del empleo de un electrodo compuesto y la incorporación de nanopartículas de oro en la matriz para la inmovilización de las biomoléculas, proporcionando unas excelentes características, de sensibilidad, selectividad y de estabilidad operacional.

Se han preparado tres inmunosensores haciendo uso de electrodos compósitos de grafito-Teflón modificados con nanopartículas de oro, dos de ellos para la determinación de progesterona y uno para la determinación de inmunoglobulina G, habiéndose aplicado al análisis de leche y suero, respectivamente.

### **III.2.1. INMUNOSENSORES COMPÓSITOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA**

La importancia del desarrollo de dispositivos que permitan obtener bajos límites de detección para la monitorización diaria de progesterona en leche se debe principalmente al gran interés existente en la predicción de los períodos de fertilidad de las vacas, ya que tras la ovulación los niveles de progesterona decaen bruscamente a concentraciones comprendidas entre 1 y 5 ng mL<sup>-1</sup>. La necesidad de mejorar los métodos existentes implica la disminución de los límites de detección, así como el aumento de la sensibilidad. Con el fin de alcanzar estos objetivos, se han desarrollado dos inmunosensores electroquímicos para la determinación de esta hormona, uno de ellos basado en el empleo del electrodo compuesto Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón y el otro en la utilización de un biosensor de Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón como transductor amperométrico.

A continuación se comentan los aspectos que se han considerado más relevantes de cada uno de estos inmunosensores, así como los resultados de algunos otros estudios que no aparecen recogidos en las publicaciones correspondientes.

#### **III.2.1.1. INMUNOSENSOR BASADO EN EL EMPLEO DE UN ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO**

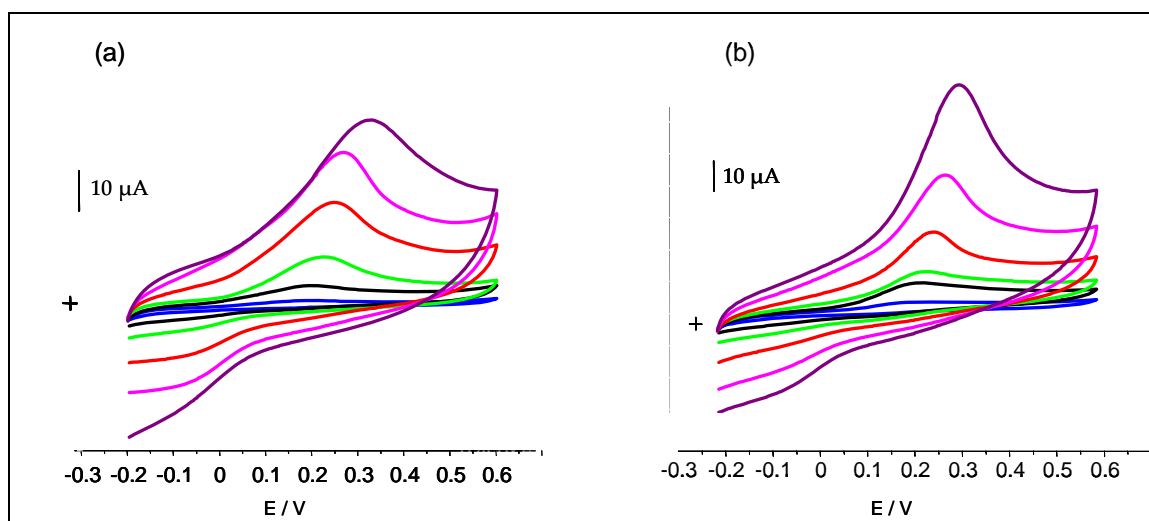
##### **III.2.1.1.1. Estudio de la oxidación electroquímica del naftol sobre electrodos de grafito-Teflón y grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro**

El naftilfosfato fue escogido como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina empleada en el marcaje de los anticuerpos utilizados en el desarrollo del inmunosensor de progesterona. Dado que el producto de la reacción enzimática

es el naftol, se consideró conveniente realizar estudios sobre la oxidación electroquímica del naftol sobre las superficies electródicas empleadas.

Con objeto de comprobar el efecto catalítico que ejercen las nanopartículas de oro sobre la oxidación de dicho compuesto, se evaluó la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre la intensidad y el potencial de pico mediante voltamperometría cíclica empleando un electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro. Con fines comparativos, se llevó a cabo el mismo estudio sobre un electrodo sin modificar con el nanomaterial.

En la *Figura 24* se muestran los voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido para una disolución de naftol  $5 \times 10^{-4}$  M en medio dietanolamina 0.1 M de pH 10.0 sobre ambas superficies electródicas.



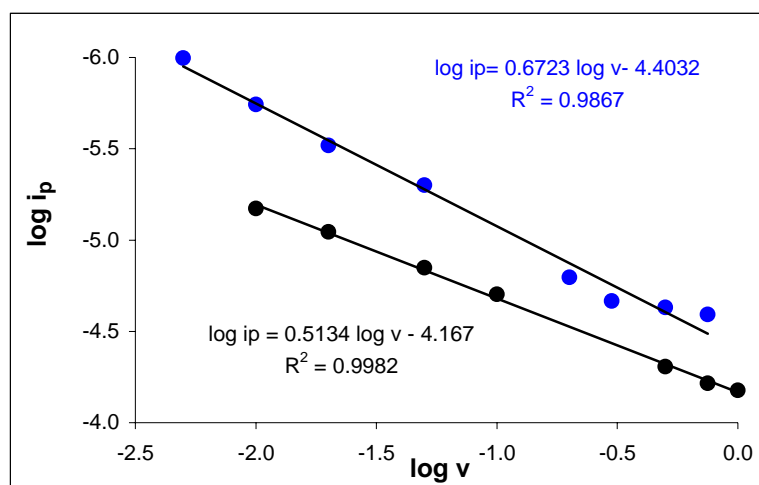
**Figura 24.-** Voltamperogramas cíclicos para una disolución de naftol  $5 \times 10^{-4}$  M en medio DEA 0.1 M de pH 10.0, sobre un electrodo de grafito-Teflón (a) y un electrodo de Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón (b) a diferentes velocidades de barrido, —5, —20, —50, —100, —200, —300 mV/s.

Como puede observarse, el potencial de pico aumenta ligeramente a medida que aumenta la velocidad de barrido de potencial sobre ambos

electrodos. Además, sobre el electrodo modificado con nanopartículas de oro los picos de oxidación del naftol son más estrechos y aparecen a potenciales menos positivos que en ausencia del nanomaterial, lo que se atribuye al efecto catalítico que ejercen las nanopartículas de oro en la oxidación del compuesto fenólico.

Asimismo, se aprecia un aumento de la intensidad de pico con la velocidad de barrido, siendo superior para el electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro, atribuible igualmente al efecto catalítico que ejercen las nanopartículas del metal.

En la *Figura 25* se muestran las representaciones del logaritmo de la intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido para ambas superficies electródicas, observándose un ajuste lineal en ambos casos. Cuando se empleó un electrodo de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro la pendiente de la recta obtenida fue de 0.67, lo que indica que se trata de un sistema que no está totalmente controlado por difusión, sino que presenta una cierta componente catalítica. Por otro lado, cuando se trabajó con un electrodo de grafito-Teflón se obtuvo un valor de la pendiente de la recta muy próxima a 0.5, lo que indica que en este caso el proceso sí está controlado por difusión.



**Figura 26.-** Representación del logaritmo de la intensidad de corriente frente al logaritmo de la velocidad de barrido para una disolución de naftol  $5 \times 10^{-4}$  M empleando un electrodo de grafito-Teflón (●) y Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón (●).

Otros parámetros calculados empleando estas superficies electródicas han sido los *coeficientes de difusión* del naftol y el coeficiente de *transferencia de carga*.

Los valores obtenidos para los *coeficientes de difusión* del naftol calculados mediante cronoamperometría (apartado II.2.4.) son  $3.87 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s y  $2.75 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s para los electrodos de grafito Teflón y de Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón respectivamente. Como era de esperar, los coeficientes de difusión del naftol obtenidos son muy similares para ambos electrodos dada la ausencia de especies bloqueantes sobre la superficie que pudiera dificultar el acceso del compuesto fenólico al electrodo.

El valor de  $\alpha n_a$ , calculado mediante las correspondientes pendientes de Tafel, es de 0.53 y 0.45 para el electrodo de grafito-Teflón y de grafito-Teflón modificado con nanopartículas de oro, respectivamente. Estos valores, próximos a 0.5, indican que se intercambia un único electrón en la etapa limitante de la velocidad. En el caso del electrodo de grafito-Teflón, como ya se ha demostrado anteriormente, el proceso de transferencia electrónica está

controlado por difusión, por lo que dicho parámetro también puede calcularse a partir de la pendiente de la representación de la intensidad de corriente frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ó a partir de la diferencia entre los potenciales de pico y semipico correspondientes a la oxidación del naftol, obteniéndose unos valores de  $\alpha_{na}$  de 0.49 y 0.41 por ambos métodos respectivamente, próximos al valor de 0.53 obtenido a partir de la pendiente de Tafel.

#### **III.2.1.1.2. Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un electrodo Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón**

El inmunosensor de progesterona desarrollado hace uso de una matriz compósita modificada con nanopartículas de oro (Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón) sobre la que se inmoviliza directamente el anticuerpo, anti-Progesterona. El empleo de nanopartículas de oro como modificador de la superficie electródica proporciona una serie de ventajas para el desarrollo de este tipo de dispositivos. Por un lado, permite la inmovilización directa de los anticuerpos sin necesidad de efectuar ningún tipo de reacción química, manteniéndose la actividad biológica de la biomolécula, y por otro, el efecto catalítico que ejerce sobre la oxidación electroquímica del naftol permite aplicar un potencial de detección menor que en ausencia de nanopartículas de oro, con lo que se minimizan posibles interferencias.

Con fines comparativos, y para corroborar las ventajas del empleo de las nanopartículas de oro, se preparó un inmunosensor construido de forma análoga pero en ausencia del nanomaterial. En este caso se observó un decrecimiento paulatino de la respuesta amperométrica atribuido a una deficiente inmovilización del anticuerpo sobre la superficie electródica dando lugar a una respuesta menos estable. Este hecho pone de manifiesto la ventaja ya conocida del empleo de este nanomaterial para llevar a cabo la

inmovilización de moléculas biológicas. Además, en ausencia de las nanopartículas de oro se comprobó que, para una misma concentración de progesterona, la respuesta del inmunosensor era menor, dando lugar a una disminución en la sensibilidad.

En cuanto a los resultados alcanzados con el inmunosensor desarrollado, es importante resaltar la buena linealidad obtenida para bajas concentraciones de progesterona y la alta sensibilidad alcanzada con respecto a otros inmunosensores de progesterona encontrados en la bibliografía, citando como ejemplo el basado en el empleo de un electrodo serigrafiado de carbono [Xu F., 2005]. En muchos de los dispositivos la determinación de progesterona a bajas concentraciones se ve dificultada por el denominado efecto hook, no pudiéndose apreciar diferencias en la respuesta correspondiente a bajas concentraciones progesterona. Por otra parte, es de destacar que la sensibilidad obtenida con el inmunosensor compuesto presentado en este trabajo es tres veces superior a la del inmunosensor serigrafiado. Por último, la buena repetibilidad de las medidas y la aceptable reproducibilidad en la fabricación del inmunosensor permite detectar pequeños cambios de concentración de progesterona a niveles fisiológicos relacionados con los controles de fertilidad.

El inmunosensor desarrollado se ha utilizado para la determinación de progesterona en leche. El procedimiento experimental llevado a cabo fue extremadamente sencillo, consistente únicamente en diluir la muestra enriquecida con la concentración de progesterona adecuada, hasta un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  con la disolución reguladora. Para realizar el inmunoensayo, 3  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida se mezclan con 5  $\mu\text{L}$  de progesterona marcada con fosfatasa alcalina y se depositan sobre la superficie del inmunosensor. Tras dejar secar la superficie durante dos horas a temperatura ambiente, se realiza el inmunoensayo.

La existencia de efecto matriz debido probablemente a la presencia de sustancias como proteínas, grasas, etc., que ensucian la superficie del inmunosensor, hizo necesario realizar un calibrado en leche. Como era de esperar, el intervalo de concentraciones útil fue menor, de 0 a 15 ng mL<sup>-1</sup>, siendo también menor la pendiente del calibrado de -0.9 nA ng<sup>-1</sup> mL. No obstante, dicho intervalo de concentración es suficiente para determinar progesterona en leche a las concentraciones requeridas para llevar a cabo el seguimiento de los periodos de fertilidad de las vacas necesario para su posterior fecundación.

### **III.2.1.2. INMUNOSENSOR BASADO EN UNA SUPERFICIE DE GRAFITO-TEFLÓN MODIFICADA CON NANOPARTÍCULAS DE ORO Y TIROSINASA**

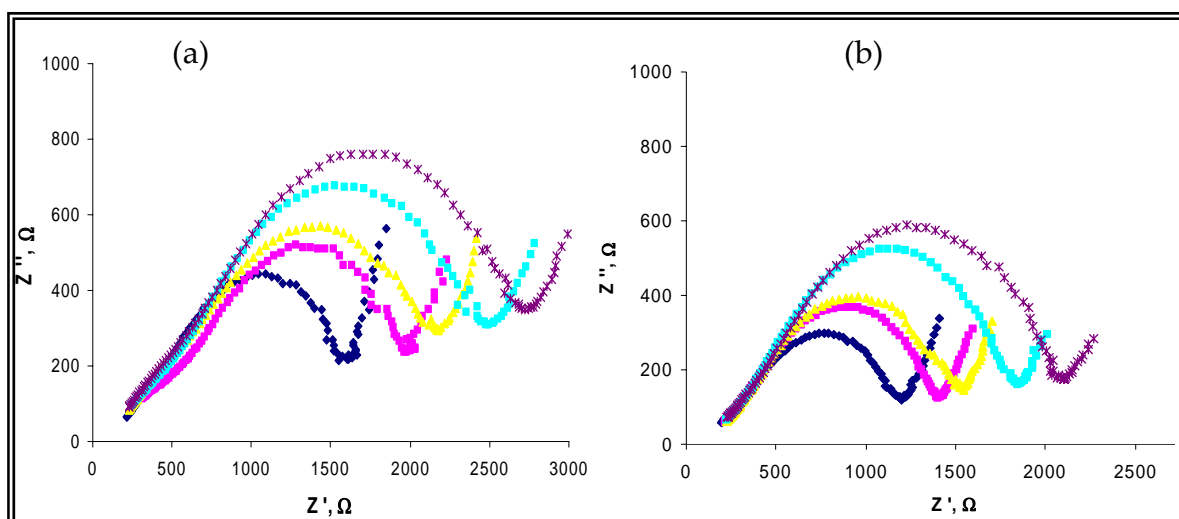
Una alternativa al método de detección de la interacción antígeno-anticuerpo descrito anteriormente para la determinación de progesterona, es el empleo como transductor electroquímico de un biosensor compuesto de tirosinasa modificado con nanopartículas de oro (Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón). La incorporación de dicha enzima en la matriz tridimensional permite la oxidación catalítica del fenol generado en la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina a la correspondiente quinona, cuya reducción electroquímica puede monitorizarse sobre la superficie electródica. Este nuevo diseño del inmunosensor produce además de una amplificación de la respuesta, una disminución del potencial de detección.

A continuación se comentan algunos aspectos relacionados con la preparación del inmunosensor, como es el seguimiento de cada una de las etapas de modificación de la superficie electródica mediante espectroscopia de impedancia electroquímica, así como otros aspectos relevantes de su desarrollo.

#### **III.2.1.2.1. Caracterización de las superficies electródicas mediante espectroscopia de impedancia electroquímica**

Se registraron los espectros de impedancia electroquímica correspondientes a cada una de las etapas implicadas en la preparación del inmunosensor, así como los correspondientes a la superficie electródica tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Asimismo, con fines comparativos se han obtenido los diagramas de Nyquist correspondientes a las mismas etapas en ausencia de nanopartículas de oro en la matriz compósita.

En la *Figura 27* se muestran los espectros de impedancia electroquímica obtenidos para ambos casos.



**Figura 27.-** Espectros de impedancia electroquímica para los inmunosensores de anti-Prog-grafito-Teflón (a) y anti-Prog-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón (b). (●) biosensor, (●) + anti-progesterona, (●) + BSA, (●) + progesterona 50 ng mL<sup>-1</sup>, (●) + progesterona-AP. Medidas realizadas en medio K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) / K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) 5 Mm en KCl 0.1 M.

Como puede observarse, a medida que se van incorporando diferentes biomoléculas a la superficie eléctrica, va aumentando el diámetro del semicírculo que aparece en la zona de altas frecuencias del diagrama de Nyquist. Ello se debe a una dificultad creciente en el proceso de transferencia de carga debido a un bloqueo cada vez mayor de la superficie eléctrica. Estas experiencias ponen de manifiesto que se produce la inmovilización del anticuerpo sobre ambas superficies eléctricas, así como la reacción de interacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar.

En la *Tabla 16* se recogen los valores de la resistencia a la transferencia de carga correspondientes a los diagramas de Nyquist de la *Figura 27*.

**Tabla 16.-** Comparación de la resistencia a la transferencia de carga en las diferentes etapas de modificación de los inmunosensores con ambas superficies electródicas.

<i>Superficie sensora</i>	<i>Bioelectrodos</i>	<i>+ anti-prog</i>	<i>+ BSA</i>	<i>+Prog 50 ng/mL</i>	<i>+ Prog-AP</i>
$R_{ct}(Tir-Au\ col-GT), \Omega$	(1045 ±95)	(1215 ± 60)	(1280 ± 110)	(1555 ± 100)	(1770 ±160)
$R_{ct}(Tir-GT), \Omega$	(1500 ± 80)	(1615 ± 200)	(1950 ± 70)	(2185 ± 90)	(2435 ± 90)

Por otro lado, estos resultados confirman nuevamente que el empleo de electrodos modificados con nanopartículas de oro favorece la transferencia electrónica, obteniéndose en todos los casos un menor valor de la  $R_{ct}$ . Estos resultados son coherentes con los obtenidos mediante amperometría, donde se obtiene una importante mejora de la sensibilidad cuando se incorpora el nanomaterial a la matriz.

#### **III.2.1.2.2. Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un electrodo *Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón***

El hecho de emplear el biosensor de tirosinasa como transductor para monitorizar electroquímicamente la reacción antígeno-anticuerpo ha permitido emplear un potencial de detección tan bajo como -0.1 V. Además, se ha demostrado que la presencia de las nanopartículas de oro en la matriz electródica origina un aumento de la cinética de la reacción enzimática de oxidación del compuesto fenólico, así como de la reacción de reducción de la quinona sobre la superficie del electrodo, dando lugar a un aumento considerable de la sensibilidad.

Para el diseño del nuevo inmunosensor de progesterona se optimizaron cada una de las etapas implicadas en su preparación, así como las variables

experimentales que están implicadas en el inmunoensayo competitivo secuencial propuesto.

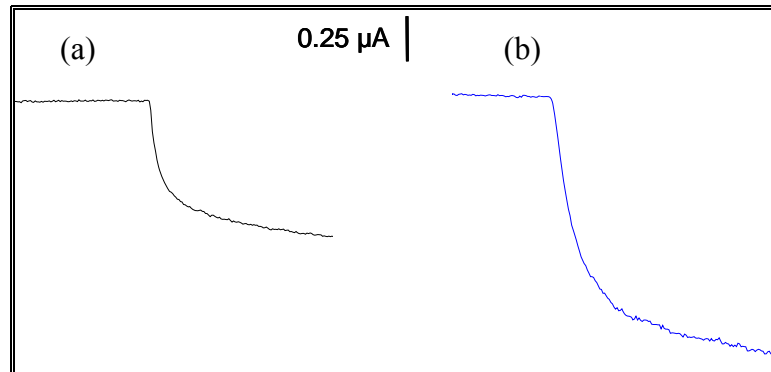
Es de destacar la elección de fenilfosfato como sustrato de la fosfatasa alcalina en lugar de naftilfosfato, debido a que la oxidación del naftol por acción de la tirosinasa para dar origen a la quinona correspondiente no es favorable; no observándose señal de reducción sobre la superficie electródica para valores de potencial comprendidos entre 0 y -0.2 V.

Otra variable importante es el pH del medio, ya que su valor influye de manera decisiva en la actividad de las enzimas empleadas, así como en la reacción electródica. Además, el pH óptimo de las enzimas fosfatasa alcalina y tirosinasa no es el mismo, siendo básico para la primera y neutro o ligeramente ácido para la segunda. Las medidas amperométricas con el inmunosensor bienzimático a diferentes pHs permiten obtener una mayor sensibilidad a pH 7, lo que sugiere que la reacción catalizada por la enzima tirosinasa condiciona más la respuesta de corriente obtenida que la reacción de hidrólisis del sustrato de la fosfatasa alcalina.

Al igual que para el diseño anterior del inmunosensor, se comparó la respuesta amperométrica obtenida con este nuevo diseño, con la proporcionada por un inmunosensor preparado en idénticas condiciones pero en ausencia de nanopartículas de oro en la matriz electródica. En este último caso, se observó que la inmovilización del anticuerpo, anti-progesterona, sobre la superficie del electrodo es menos estable, ya que la respuesta decae un 25 % hasta su estabilización con respecto a la primera medida. Además la intensidad de corriente es un 58% menor que la obtenida con el inmunosensor en presencia de las nanopartículas de oro.

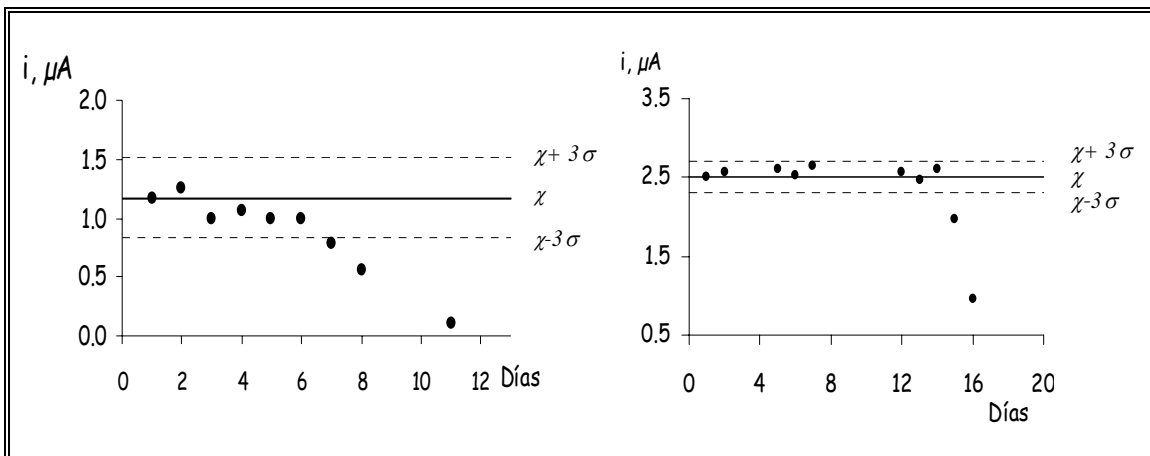
A modo de ejemplo en la *Figura 28* se muestran los amperogramas obtenidos para una concentración de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de progesterona empleando el

inmunosensor construido con de las nanopartículas de oro, así como en ausencia de las mismas una vez alcanzada la estabilización de la señal.



**Figura 28.-** Amperogramas obtenidos para una concentración de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de Progesterona empleando como transductores un biosensor de Tir-grafito-Teflón (a) y un biosensor Tir-Au col-grafito-Teflón (b).

Por otra parte, los gráficos de control construidos para ambos inmunosensores (Fig. 29) muestran como el tiempo de vida útil es mayor cuando el transductor es el biosensor modificado con el nanomaterial.



**Figura 29.-** Gráficos de control para los inmunosensores construidos empleando como transductores un biosensor de (a) Tir- GT y (b) Tir- Au col-GT, para la determinación de progesterona  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  en medio TRIS  $0.1 \text{ M}$  de pH  $7.0$  y  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mM}$ .  $E_{ap} = -0.1 \text{ V}$

El inmunosensor desarrollado permite la obtención de calibrados lineales hasta una concentración de 50 ng mL<sup>-1</sup>, siendo el límite de detección de 0.43 ng mL<sup>-1</sup>.

En cuanto a su aplicabilidad, hay que destacar que el inmunosensor desarrollado ha permitido llevar a cabo la determinación de progesterona en muestras de leche entera sin necesidad de realizar ningún pretratamiento a la muestra. La existencia de efecto matriz hace necesario realizar un calibrado para progesterona empleando leche como matriz.

Es de destacar, la buena linealidad obtenida para bajas concentraciones de progesterona, a diferencia de los resultados obtenidos empleando otros diseños del inmunosensor encontrados en la bibliografía, los cuales, presentan una curvatura a bajas concentraciones (efecto hook) [Xu Y.F., 2005]. Asimismo cabe resaltar el aumento de sensibilidad observado respecto del mismo dispositivo en ausencia de nanopartículas del metal.

### **III.2.1.3. COMPARACIÓN DE LOS INMUNOSENSORES BASADOS EN UNA SUPERFICIE ELECTRÓDICA Au<sub>col</sub>-GRAFITO-TEFLÓN Y Tir-Au<sub>col</sub>-GRAFITO-TEFLÓN**

En esta Memoria se han preparado dos inmunosensores que hacen uso de una matriz compósita de grafito-Teflón modificada con oro coloidal como transductor electroquímico para la determinación de progesterona. Los resultados demuestran que ambos diseños resultan adecuados para la determinación de esta hormona en leche. Como ya se ha comentado, la incorporación de las nanopartículas metálicas a la matriz electródica proporciona notables ventajas resultantes en aumento de la sensibilidad, menores límites de detección, así como en la obtención de una superficie adecuada para la inmovilización de biomoléculas sin pérdidas de su bioactividad.

En cuanto al segundo inmunosensor desarrollado, destacar que la incorporación de Tirosinasa a la matriz compósita ha dado lugar a un nuevo diseño de inmunosensor con una mayor sensibilidad y mejores límites de detección. Además, el potencial de detección disminuye de +0.3 V a -0.1V, lo que conduce a un aumento de la selectividad en la determinación.

A modo de comparación se recogen en la *Tabla 18* las características analíticas obtenidas para ambos inmunosensores.

**Tabla 18.-** Comparación de las características analíticas de ambos biosensores para la determinación de progesterona.

<i>Inmunosensor</i>	<i>anti-prog-Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	<i>anti-prog-Au<sub>col</sub>-GT</i>
<i>Intervalo lineal, ng/mL</i>	0-40	0-50
<i>Sensibilidad, nA mL/ ng</i>	(-82.3 ±0.4)	(-1.197 ± 0.008)
<i>Coefficiente de correlación</i>	0.995	0.98
<i>Límite de detección, ng/mL</i>	0.37	0.84

Como puede observarse, el empleo del biosensor como transductor amperométrico produce un aumento de la sensibilidad de aproximadamente un 80%, así como una disminución del límite de detección obtenido, de 0.84 ng mL<sup>-1</sup> en ausencia de tirosinasa, a 0.37 ng mL<sup>-1</sup> en presencia de la misma.

### **III.2.2. INMUNOSENSOR COMPÓSITO PARA LA DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G**

El empleo de matrices compósitas de grafito-Teflón modificadas con oro coloidal y tirosinasa, ha demostrado ser una herramienta muy útil para el desarrollo de inmunosensores, reuniendo las propiedades idóneas para la monitorización de la reacción antígeno-anticuerpo. Entre ellas cabe destacar, la capacidad de mantener la actividad biológica de las biomoléculas inmovilizadas, así como facilitar los sitios de biorreconocimiento de manera que la superficie proporcione un reconocimiento rápido y eficaz.

Este hecho se ha aprovechado para llevar a cabo el desarrollo de un inmunosensor basado en un ensayo tipo sándwich para la determinación de inmunoglobulina G habiéndose aplicado a la determinación de dicho analito en suero. La importancia de la determinación de este tipo de inmunoglobulinas se debe, por un lado, a que se trata de la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta y, por otro, a que las reacciones alérgicas que no se manifiestan de manera inmediata tras la ingesta del alimento, son mediadas por esta inmunoglobulina.

A continuación se comentan los aspectos más relevantes del inmunosensor desarrollado.

#### **III.2.2.1. Aspectos más relevantes del inmunosensor basado en un biosensor Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón como transductor**

El empleo del biosensor compósito modificado con nanopartículas de oro para la determinación de inmunoglobulina G presenta excelentes características analíticas, en cuanto a sensibilidad y estabilidad, comparado con otros inmunosensores encontrados en la bibliografía.

Por un lado, la presencia del nanomaterial permite una inmovilización más eficiente las moléculas biológicas, manteniendo su bioactividad, y por otro, la incorporación de la tirosinasa en la matriz compósita permite llevar a cabo la detección amperométrica a un valor del potencial de -0.1 V para la determinación de la inmunoglobulina, lo que implica minimizar posibles interferencias electroquímicas.

La modificación de la superficie electródica con Proteína A constituye una etapa crucial en el desarrollo del inmunosensor, ya que esta proteína posee una alta afinidad por los aminoácidos de la región F<sub>c</sub> de las inmunoglobulinas, consiguiéndose, de este modo, una perfecta orientación del anticuerpo facilitando posteriormente el inmunoensayo. La unión de la proteína A con la región F<sub>c</sub> de la inmunoglobulina implica la formación de enlaces no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Estos enlaces son débiles si se consideran por separado, sin embargo la totalidad de las interacciones producen una energía de unión que equivale o supera a un enlace covalente. Esta proteína ha sido empleada en otras configuraciones electródicas encontradas en la bibliografía para la inmovilización de inmunoglobulinas, consiguiéndose igualmente una perfecta orientación del anticuerpo [Zacco, 2004].

En este caso el inmunoensayo realizado es de tipo sándwich, donde el primer anticuerpo (anti-inmunoglobulina G) se inmoviliza sobre la superficie sólida previamente modificada con proteína A. El anticuerpo secundario, conjugado con la fosfatasa alcalina, se une al antígeno (inmunoglobulina G) tras una etapa de incubación, quedando el analito, de este modo, entre los dos anticuerpos. A la hora de llevar a cabo el inmunoensayo es necesario tener en cuenta que ambos anticuerpos han de estar en exceso; el primero de ellos para

permitir una adsorción completa del antígeno y el segundo, para asegurar la marcación completa del inmunocomplejo.

Mediante espectroscopia de impedancia electroquímica se realizó un seguimiento del desarrollo del inmunosensor, así como del inmunoensayo, observándose un aumento de la resistencia a la transferencia de carga a medida que se va modificando la superficie electródica como consecuencia de un mayor bloqueo de la misma.

Con fines comparativos se llevo a cabo la preparación de otro inmunosensor de inmunoglobulina G, siguiendo el mismo procedimiento experimental, pero sin utilizar proteína A. En este caso, y como era de esperar, se obtuvieron peores resultados que con el inmunosensor diseñado con proteína A ya que no se consigue la orientación adecuada de la anti-inmunoglobulina, dificultándose la posterior interacción antígeno-anticuerpo. Así, se obtuvo una desviación estándar relativa del 14.3% (n=5) para las medidas realizadas con inmunosensores sin proteína A, mientras que en presencia de dicha proteína el valor de RSD fue del 4.8% (n=5), lo que pone de manifiesto una mayor reproducibilidad con los inmunosensores construidos con electrodos modificados con proteína A.

De forma análoga, se preparó un inmunosensor sin nanopartículas de oro, comprobándose como la presencia del oro coloidal permite una mejor inmovilización del material proteico, obteniéndose, además de mejores características analíticas, una mayor estabilidad del inmunosensor. En la *Tabla 19* se muestran los resultados obtenidos con ambas configuraciones.

**Tabla 19.-** Comparación de las características analíticas de ambos biosensores para la determinación de inmunoglobulina G.

<i>Inmunosensor</i>	<i>anti-IgG-Tir-Au<sub>col</sub>-GT</i>	<i>anti-IgG-Tir-GT</i>
<i>Intervalo lineal, ng/mL</i>	5-100	10-65
<i>Sensibilidad, nA mL/ ng</i>	(11.8 ±0.5)	(4.6 ± 0.4)
<i>Coefficiente de correlación</i>	0.992	0.990
<i>Límite de detección, ng/mL</i>	2.6	4.1
<i>Tiempo de vida útil, días</i>	16	5

Por tanto, se empleó el biosensor Tir-Au<sub>col</sub>-grafito-Teflón como superficie electródica para el desarrollo del inmunosensor, modificándose dicha superficie con proteína A para la posterior inmovilización del anticuerpo. Una vez realizado el inmunoensayo se llevó a cabo la determinación de IgG en muestras de suero previamente enriquecidas, así como en una muestra de suero certificada siguiendo los procedimientos descritos en el apartado II.4.3.

En cuanto a la determinación de IgG en muestras de suero certificado fue necesario llevar a cabo una dilución 1:1000 de la muestra, debido al alto contenido de inmunoglobulina presente en el suero (3118 mg dL<sup>-1</sup> de IgG). En ambos casos se obtuvieron resultados satisfactorios, obteniéndose en el caso del suero enriquecido una recuperación de (104 ± 6) % y del (103±3) % para la muestracertificada.

---

---

# *PUBLICACIONES*

---

---

---

Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines

---

V. Carralero, M.L. Mena, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón

*Analytica Chimica Acta*

528, 1-8 (2005)





## Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines

V. Carralero Sanz, M<sup>a</sup> Luz Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón\*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain*

Received 1 July 2004; received in revised form 5 October 2004; accepted 5 October 2004

Available online 13 November 2004

### Abstract

The preparation of a tyrosinase biosensor based on the immobilization of the enzyme onto a glassy carbon electrode modified with electrodeposited gold nanoparticles (Tyr-nAu-GCE) is reported. The enzyme immobilized by cross-linking with glutaraldehyde retains a high bioactivity on this electrode material. Under the optimized working variables (a Au electrodeposition potential of  $-200$  mV for 60 s, an enzyme loading of 457 U, a detection potential of  $-0.10$  V and a  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution of pH 7.4 as working medium) the biosensor exhibited a rapid response to the changes in the substrate concentration for all the phenolic compounds tested: phenol, catechol, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid and protocatechualdehyde. A R.S.D. of 3.6% ( $n=6$ ) was obtained from the slope values of successive calibration plots for catechol with the same Tyr-nAu-GCE with no need to apply a cleaning procedure to the biosensor. The useful lifetime of one single biosensor was of at least 18 days, and a R.S.D. of 4.8% was obtained for the slope values of catechol calibration plots obtained with five different biosensors. The kinetic constants and the analytical characteristics were calculated for all the phenolic compounds tested. The Tyr-nAu-GCE was applied for the estimation of the phenolic compounds content in red and white wines. A good correlation of the results ( $r=0.990$ ) was found when they were plotted versus those obtained by using the spectrophotometric method involving the Folin-Ciocalteu reagent.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Gold nanocrystal-modified glassy carbon electrodes; Tyrosinase biosensors; Phenolic compounds; Wines

### 1. Introduction

As it is well known, tyrosinase (Tyr) is a monophenol mono-oxygenase which catalyzes the oxidation of the phenol group to *o*-quinone, thus allowing a variety of phenolic compounds to be used as substrates of this enzyme. Several amperometric biosensors based on the immobilization of Tyr at different electrode material have been described in the literature. Glassy carbon electrodes modified with polymers [1], sol-gel materials [2,3], self-assembled monolayers (SAMs)

on gold [4], Clark's electrodes [5–7], reticulated vitreous carbon (RVC) [8], screen-printed [9] carbon paste [10–13] and other composite electrodes [14,15] have been used to prepare Tyr electrochemical biosensors. Some of the analytical characteristics of these bioelectrodes for the determination of phenolic compounds are summarized in Table 1.

On the other hand, the use of gold nanoparticles is playing an increasing important role for the preparation of biosensors [16]. Among other properties, they provide a stable surface for enzyme immobilization, and allow the electrochemical sensing to be performed without the need of external electron-transfer mediators. Gold nanoparticles can act as nanoscale electrodes that electrically communicate between

\* Corresponding author. Tel.: +34 913944297; fax: +34 913944295.  
E-mail address: [pingarro@quim.ucm.es](mailto:pingarro@quim.ucm.es) (J.M. Pingarrón).

Table 1  
Some analytical characteristics of Tyr amperometric biosensors for phenolic compounds

Biosensor	$E_{det}/$ technique	$K_M^{app}$ (M)	Analyte/sample	Linear range ( $\times 10^7$ M)	Slope, $A$ ( $M^{-1}$ )	LOD ( $\times 10^7$ M)	Repeatability R.S.D. (%)	Useful lifetime	References
Tyr/PEDT-GCE	-200 mV	-	Phenol herbicides	-	0.1412 <sup>a</sup> , 0.0429 <sup>b</sup> ( $S=0.07068$ cm <sup>2</sup> )	0.5 <sup>b</sup>	-	30% activity after 12 days	[1]
Tyr-TiO <sub>2</sub> -sol-gel-GCE	-150 mV	$2.9 \times 10^{-4}$	Phenol	1.2-2600 <sup>b</sup>	0.103 <sup>b</sup>	1.0	2.8 ( $n=9$ )	80 days	[2]
Tyr-SiO <sub>2</sub> -sol-gel-GCE	0 mV	-	Phenols	1.0-1000 <sup>a</sup>	0.0596 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	1.8 ( $n=8$ )	110 days	[3]
Tyr/MPA/AuE	-100 mV/FI	$3.345 \times 10^{-4a}$ , $1.464 \times 10^{-4b}$	Phenols/waste waters	2-1000 <sup>a</sup> , 2-2000 <sup>b</sup>	0.034 <sup>a</sup> , 0.014 <sup>b</sup>	1.1 <sup>a</sup> , 0.88 <sup>b</sup>	2.6 <sup>a</sup> ( $n=50$ ), 3.6 <sup>b</sup> ( $n=50$ )	5 days	[4]
Tyr/GDH/ClarkE	-600 mV	-	Catecholamines, phenols	0.1-7	-	0.1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup> ( $n=9$ )	Various months	[5]
Tyr/polyacrilamide/ClarkE	-700 mV	-	Polyphenols/ <i>E. coli</i>	-	-	-	7 <sup>a</sup> ( $n=5$ )	7 days	[6]
Tyr/ClarkE	-600 mV	-	Polyphenols/wine	-	0.073 <sup>b</sup>	-	-	-	[7]
Tyr-RVCE	-0.20 mV/FI	-	Phenol herbicides	5-300 <sup>b</sup>	0.0082	2.6	2.4 ( $n=5$ )	20 days	[8]
PCS(Tyr)-HRP-SPCE	-50 mV	-	Phenols/waters	0.25-450	0.0623 <sup>b</sup>	0.025	4.5	60 days	[9]
Tyr-Au-CPE	-150 mV	$53.6 \times 10^{-6b}$	Phenol, catechol dopamine	40-480	0.023	0.061	3.2 ( $n=6$ )	2 weeks	[10]
Tyr-PS 086-CPE	-200 mV/HPLC	-	Phenols	Up to 1000	0.093	-	-	-	[11]
Tyr-Ru-CPE	-100 mV	-	Polyphenols/wine	59-3530 (gallic acid)	-	5.9	<5	3-4 h	[12]
Tyr-Ru-CPE	0 mV/FI	-	Phenol	Up to 6000	0.00081	150	2.4 ( $n=40$ )	-	[13]
Tyr/C-EPD	-150 mV	$5.63 \times 10^{-5a}$ , $6.26 \times 10^{-5b}$	Phenols	0.5-80 <sup>a</sup> , 0.5-60 <sup>b</sup>	0.66 <sup>a</sup> , 0.62 <sup>b</sup>	0.28 <sup>a</sup> , 0.26 <sup>b</sup>	4.3 ( $n=10$ ) <sup>b</sup>	5 days	[14]
Tyr-C-Teflon	-150 mV	$4.99 \times 10^{-5a}$ , $7.76 \times 10^{-5b}$	Phenols	1-150 <sup>a</sup> , 1-250 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup> , 0.28 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	[14]
Tyr-C-epoxi	-100 mV/FI	-	Phenols	1.0 <sup>b</sup>	-	-	<2 ( $n=100$ )	30 days	[15]

MPA: 3-mercaptopropionic acid; C-EPD: graphite-ethylene propylene diene; PEDT: poly(3,4-ethylenedioxythiophene); PCS: poly(carbamoylsulfonate); HRP: horseradish peroxidase; SPCE: screen-printed carbon electrode; FI: flow injection.

<sup>a</sup> Catechol.

<sup>b</sup> Phenol.

enzymes and bulk electrode materials. The conductivity properties of such materials allow to design simple, sensitive and stable electroanalytical procedures based on enzyme immobilization [17]. Thus, colloidal gold deposited on SAMs modified-gold electrodes has been used for the immobilization of HRP [18]. More recently, colloidal-gold modified carbon paste electrodes have been employed to develop glucose oxidase [19] and tyrosinase [10] biosensors. On the other hand, gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes (nAu-GCEs) have been characterized [20] and used for the formation of self-assembled monolayers [21]. These nAu-GCEs have demonstrated to exhibit high catalytic activity towards some electrooxidation reactions [22]. Concerning biosensors based on the use of nAu-GCEs, the only reference found in the literature was the preparation of an electrode based on xanthine oxidase adsorbed to colloidal gold and evaporated onto the surface of glassy carbon [23].

In this work, we report on the preparation of a tyrosinase biosensor based on the use of a glassy carbon electrode modified with electrodeposited gold nanoparticles (Tyr-nAu-GCE). The immobilized enzyme retains a high bioactivity on this electrode material, giving rise to fast, stable and sensitive responses to various phenolic compounds. Moreover, and considering the nutritional importance of phenolic components, due to their antioxidant power, in wines, particularly in red wines [7], we have applied the Tyr-nAu-GCE to the amperometric estimation of the total content of phenolic compounds in this type of samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus and electrodes

Voltammetric measurements were carried out with a BAS 100B potentiostat provided with a BAS C2 EF-1080 cell stand. A Metrohm 6.084.010 glassy carbon electrode (GCE) and a Metrohm 6.1204.140 gold electrode (3.0 mm diameter each) were used as working electrodes. A BAS MF 2063 Ag/AgCl 3 M reference electrode and a Pt wire counter electrode were also employed. Amperometric measurements in stirred solutions were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab to control the potential values applied. The electrochemical software was the general purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). A HP 8453 UV-vis spectrophotometer was also used to apply the reference spectrophotometric method involving the use of Folin-Ciocalteu reagent [24].

### 2.2. Reagents and solutions

An aqueous 1%  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  solution (Sigma, >49% as Au) was used for the preparation of gold modified GC electrodes. Stock  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  solutions in water of catechol (Sigma, 99%), phenol (Scharlab, 99.5%), 3,4-dihydroxybenzaldehyde, caffeic acid, gallic acid and chloro-

genic acid (Sigma, 99%) were also used. The solutions used for the enzyme immobilization were a  $91.4 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$  solution of tyrosinase (Sigma, EC 1.14.18.1 from *Mushroom* sp.,  $2590 \text{ U mg}^{-1}$ ) prepared in a  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution of pH 7.4, and a 25% glutaraldehyde (Aldrich) solution. All other solvents and chemicals were of analytical reagent grade. The water used was obtained from a Millipore Milli-Q system.

### 2.3. Samples

The samples analysed were commercial bottled wines purchased in a local market. Three white wines with alcohol contents of 11 vol.% (sample 1), 12 vol.% (sample 2) and 15 vol.% (sample 3), and three red wines with alcohol contents of 12.5 vol.% (sample 4), and 12 vol.% (samples 5 and 6) were analyzed.

### 2.4. Procedures

#### 2.4.1. Preparation of the tyrosinase-gold nanocrystal-modified GCE (Tyr-nAu-GCE)

A  $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ HAuCl}_4$  solution was prepared in Milli-Q water previously filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  nylon filter (Whatman), and deaerated by passing a  $\text{N}_2$  stream. The GCE was polished with  $0.3 \mu\text{m}$  alumina for 1 min. Then it was rinsed with ethanol and water, alternatively, three times each, and dried using a nitrogen stream. Modification with gold nanocrystals was performed by immersion of the electrode into the  $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ HAuCl}_4$  solution and applying a potential of  $-200 \text{ mV}$  during 1 min. Then,  $5 \mu\text{l}$  (457 units) of Tyr solution were deposited on the nAu-GCE. Once the electrode surface had dried out at room temperature, the electrode was immersed in a 25% (v/v) glutaraldehyde solution for 30 min. The bioelectrode was washed with Milli-Q water and kept in  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4 until using.

Amperometric measurements in stirred solutions were performed by applying the desired potential and allowing the steady-state current to be reached.

#### 2.4.2. Measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines using the Tyr-nAu-GCE biosensor

A  $270 \mu\text{l}$  wine aliquot was directly added to 10 ml of a  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution of pH 7.4, which was continuously stirred at a constant rate in the electrochemical cell. Then, amperometric measurements at  $-100 \text{ mV}$  were carried out, and the estimation of the phenolic compounds content was performed by applying the standard additions method, which implied the addition of successive  $20 \mu\text{l}$  aliquots of a  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  phenol stock solution.

For comparison purposes, wines were also analyzed by the spectrophotometric method involving the use of Folin-Ciocalteu reagent [24]. In this method, 4.2 ml of deionized water and 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (phosphotungstic-phosphomolybdic acid) were added to 0.5 ml of sample (in the case of red wines a 1:8 dilution was

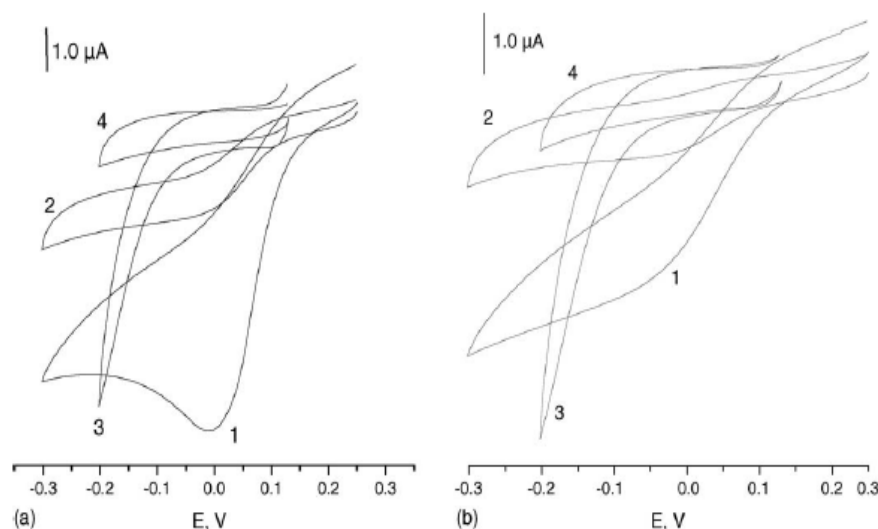


Fig. 1. Cyclic voltammograms for  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  solutions of catechol (a) and caffeic acid (b), at: (1) Tyr-nAu-GCE; (2) Tyr-GCE; (3) Au-GCE; (4) GCE;  $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$ . Supporting electrolyte:  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4).

carried out). The mixture was stirred for about 1 min, and 1.0 ml of an 80% sodium carbonate solution and 4.2 ml of deionized water were added. The resulting solution was allowed to stand for 2 h at ambient temperature in darkness. The absorbance is then read at 730 nm. The same procedure was used to construct a calibration plot with standard solutions of caffeic acid.

### 3. Results and discussion

Fig. 1 shows a comparison of cyclic voltammograms for catechol (Fig. 1a) and caffeic acid (Fig. 1b) obtained at a Tyr-nAu-GCE, at a biosensor in which Tyr was immobilized, under strictly identical conditions that those used for the Tyr-nAu-GCE, at a bare GCE (Tyr-GCE), and at a conventional naked GCE. As expected, no reduction signal was observed at the electrode with no enzyme. Moreover, although a slight reduction wave can be observed at the Tyr-GCE, the phenolic compound catalytic responses were remarkably higher at the Tyr-nAu-GCE, showing fairly well the advantages predicted for this type of biosensor configuration, commented in Section 1. Obviously, the enzyme reaction involves the catalytic oxidation of the phenolic compounds to their corresponding *o*-quinones, at the expense of reducing oxygen to water [25]. The electrochemical reduction of these quinones, by transferring two electrons and two protons, was employed to monitor this reaction.

#### 3.1. Optimization of the biosensor preparation

Concerning experimental variables involved in the electrodeposition of gold nanoparticles on the GCE surface, the concentration of the  $\text{HAuCl}_4$  solution from which the modified electrodes were prepared, was the same,  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , that

the optimized previously for the construction of the nAu-GCEs [26].

All other working variables were optimized taking the highest value of the slope obtained for catechol calibration plots in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  concentration range as a criterion of selection. Thus, the effect of the Au electrodeposition potential was checked by batch amperometry in stirred solutions, using a Tyr-nAu-GCE biosensor constructed by immobilisation of 457 units tyrosinase. Fig. 2a shows that the slope of the calibration graph for catechol increased as the electrodeposition potential became more negative up to

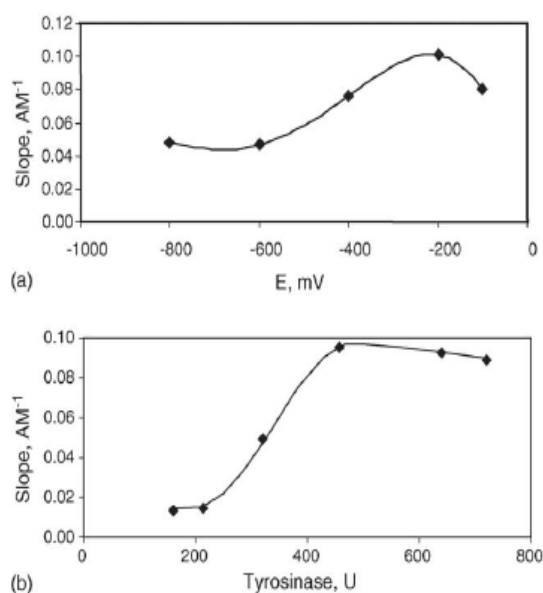


Fig. 2. Effect of the applied potential (a) and of the tyrosinase loading (b) on the slope of the calibration graph for catechol in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  concentration range. Supporting electrolyte:  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4).

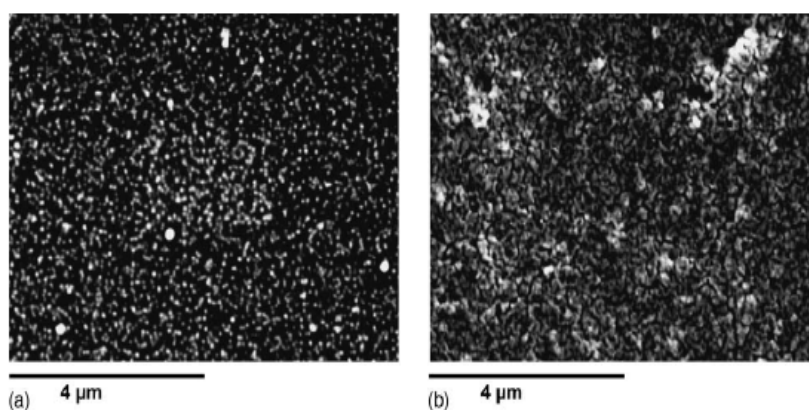


Fig. 3. Scanning electronic micrographs of a nAu-GCE (a) and a Tyr-nAu-GCE (b).

–200 mV. However, a decrease in the slope value was observed for more negative potential values. This can be attributed to the larger amount of gold electrodeposited as the potential was more negative [20]. As it has been reported for a colloidal-gold-modified carbon paste electrode [10], a large amount of gold can produce a decrease in the catalytic response as a consequence of an increase in the resistance and double layer capacitance of the modified electrode. Using –200 mV as electrodeposition potential, an electrodeposition time of 60 s showed to be sufficient for the obtention of analytically useful calibration graphs for catechol. Consequently, Tyr-nAu-GCEs were constructed by using gold nanocrystal-modified GCEs prepared by electrodeposition at –200 mV for 60 s.

Under these conditions, the enzyme loading influence was also evaluated over the 160–720 units range (Fig. 2b). The slope of the catechol calibration graph increased with the enzyme loading up to 457 U of Tyr, after which the slope value exhibited a slight decrease which can be attributed to effects such as an increase of the resistance, making the electron transfer more difficult, and concentration-dependent denaturation at the interface. Therefore, the above mentioned enzyme loading was selected for further work.

Scanning electronic micrographs of the nAu-GCE and Tyr-nAu-GCE are displayed in Fig. 3. Gold nanoparticles deposited had a mean size of around 80 nm. The surface area covered by gold was calculated from the charge corresponding to the reduction of gold oxides formed by cyclic voltammetry at  $100 \text{ mV s}^{-1}$  between –0.35 and +1.5 V in  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  [20]. From the theoretical charge transfer of  $482 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$  for the reduction of a monolayer of divalent oxygen from a gold surface [27], a gold surface area of  $0.0074 \pm 0.0003 \text{ cm}^2$  was obtained. Taking into account that the geometric area of the GCE is  $0.071 \text{ cm}^2$ , the percentage of this area covered by gold was of 10.4%.

The enzyme immobilization with glutaraldehyde can be observed by a change in topology to a speckled, grainy image (Fig. 3b), showing clusters of protein cross-linked on the surface of the nAu-GCE. This immobilization method produced a three-dimensional matrix in which the enzyme is closely

trapped with the electrode material, thus improving both the retention of the biomolecule on the electrode surface and its electrical communication.

### 3.2. Optimization of variables affecting the amperometric detection at the Tyr-nAu-GCE

The influence of the potential applied to the biosensor on the amperometric responses from different phenolic compounds is shown in Fig. 4. In general, a similar shape was observed for all of them, with an increase of the steady-state current from +0.15 V up to approximately –0.10 V. A decrease in the current was produced at more negative potentials, probably due to the polymerization of the corresponding *o*-quinone at these negative potentials [8,28]. The behaviour shown in Fig. 4 indicates that the 1,2-quinone formed in the enzyme reaction for each of the tested substrates is reduced at similar potential values. Consequently, a potential value of –0.10 V was chosen for subsequent work. The big differences in sensitivity for the different phenolic compounds, as a consequence of their different structure, can also be observed in Fig. 4.

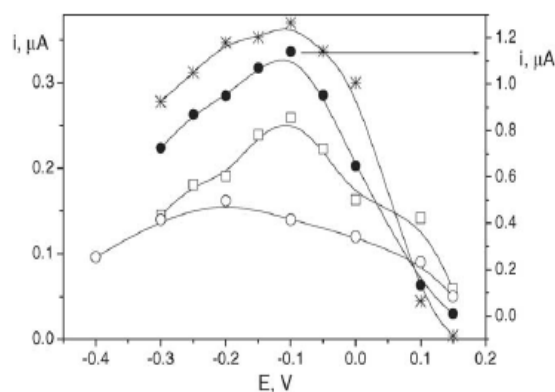


Fig. 4. Influence of the applied potential on the steady-state current for  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  phenol (\*), chlorogenic acid (○), catechol (●), and  $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  caffeic acid (□) at a Tyr-nAu-GCE.

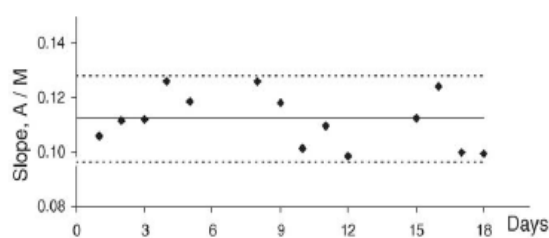


Fig. 5. Control chart constructed for a Tyr-nAu-GCE. Data shown correspond to the mean values of the slopes from three successive calibration pots for catechol in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  concentration range.  $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ ;  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4.

Concerning the effect of pH on the amperometric response, as expected, the higher steady-state currents were obtained between pH 6.5 and 7.5, and therefore, a  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4 was selected as working medium.

Under these conditions, the biosensor exhibited a rather rapid response to the changes in the substrate concentration for all the phenolic compounds tested, the steady-state current being reached in less than 2 min for the phenolic compound exhibiting the slowest kinetics (chlorogenic acid).

### 3.3. Stability of the Tyr-nAu-GCE

Different aspects regarding the stability of the biosensor were considered. First, the repeatability of the measurements was evaluated by constructing successive calibration plots for catechol in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-5} \text{ M}$  concentration range with the same Tyr-nAu-GCE. A relative standard deviation (R.S.D.) value of 3.6% ( $n=6$ ) was obtained from the slope values of such calibration graphs, which indicated a good repeatability of the measurements with no need to apply a cleaning or pretreatment procedure to the Tyr-nAu-GCE.

The useful lifetime of one single biosensor was checked by performing repetitive calibration graphs for catechol in the above mentioned concentration range, the bioelectrode being stored after use in phosphate buffer of pH 7.4 at  $4^\circ \text{C}$ . Fig. 5 shows the control chart constructed, taking the mean value of the slopes of 10 successive calibration plots obtained the first day of this study as the central value. The upper and lower limits of control were set at  $\pm 3 \times \text{S.D.}$  of this target value ( $0.113 \pm 3 \times 0.006$ ). The values shown in this figure corresponded to the mean values from the slopes of three successive calibration plots. As can be observed, these values

remained within the control limits for at least 18 days, no data being recorded for larger times.

Finally, the reproducibility of the responses obtained with different Tyr-nAu-GCEs was also evaluated. Results from five different biosensors yielded a R.S.D. of 4.8% for the slope values of the corresponding catechol calibration plots. This result demonstrated the reliability of the Tyr-nAu-GCE fabrication procedure, allowing reproducible electroanalytical responses to be obtained with different biosensors constructed in the same manner.

### 3.4. Kinetic constants and analytical characteristics

Under the experimental conditions optimized above, the kinetic parameters and the analytical characteristics of the tyrosinase reaction were calculated for the following phenolic compounds: phenol, catechol, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde (protocatechualdehyde) (Table 2). The kinetics of the enzyme reaction fitted in all cases into a Michaelis–Menten type kinetics, as demonstrated by calculation of the parameter  $x$  from the Hill's plot ( $\log[(i_{\text{max}}/i) - 1]$  versus the log of the substrate concentration), indicating that the immobilization procedure did not alter the Michaelis–Menten behaviour. Then, calculation of the apparent Michaelis–Menten constants ( $K_M^{\text{app}}$ ) and the maximum rate values of the reaction ( $V_m$ ) was accomplished from the corresponding Lineweaver–Burk plots. As it was expected, the lower  $K_M^{\text{app}}$  and the higher  $V_m$  values were obtained for catechol and phenol. Moreover, they are similar to those reported in Table 1 for other tyrosinase biosensor designs, thus revealing a good affinity of the enzyme immobilized on gold nanoparticles for these substrates.

Table 2 also summarizes the characteristics of the calibration plots obtained for the phenolic compounds tested. The corresponding limits of detection were calculated according to the  $3s_b/m$  criterion, where  $m$  is the slope value of the respective calibration graph, and  $s_b$  was estimated as the standard deviation ( $n=10$ ) of the amperometric signals from different solutions of the substrates at the concentration level corresponding to the lowest concentration of the calibration plot. As it is theoretically predicted, the sensitivity of the biosensor for each phenolic compound is higher as the corresponding  $K_M^{\text{app}}$  is lower. Moreover, when the analytical characteristics (range of linearity, sensitivity, and limit of detection) of the Tyr-nAu-GCE are compared with those shown in Table 1 for other tyrosinase biosensor designs, it can be observed

Table 2  
Kinetic parameters of the tyrosinase reaction and calibration data for different phenolic compounds obtained at Tyr-nAu-GCEs

Compound	$x$	$K_M^{\text{app}}$ (mM)	$V_m$ ( $\mu\text{A}$ )	Linear range ( $\times 10^4 \text{ M}$ )	$r$	Slope, $A$ ( $\text{M}^{-1}$ )	LOD ( $\times 10^7 \text{ M}$ )
Phenol	1.01	0.14	15.7	0.01–0.4	0.9993	0.082	2.1
Catechol	1.01	0.12	28.3	0.005–0.5	0.9998	0.107	1.5
Caffeic acid	0.99	0.22	5.9	0.02–2.0	0.998	0.014	6.6
Chlorogenic acid	1.01	0.18	4.9	0.01–2.0	0.9994	0.017	6.2
Gallic acid	0.99	0.44	0.30	0.25–9	0.998	$2.3 \times 10^{-4}$	70
Protocatechualdehyde	1.10	0.37	0.71	0.06–6	0.998	$8.3 \times 10^{-4}$	20

that they are also similar to those of the bioelectrodes exhibiting a better performance for the amperometric detection of these compounds. It is interesting to compare the performance of the Tyr-nAu-GCE with that reported for tyrosinase colloidal-gold-modified carbon paste electrodes [10]. As it can be deduced from Tables 1 and 2, the linear range for phenol (it is the only phenolic compound for which quantitative data are given in Ref. [10]) is wider, the sensitivity is higher and the useful lifetime longer with the Tyr-nAu-GCE. Moreover, it must be noted that the preparation of gold nanocrystal-GCEs by gold electrodeposition is a much more rapid, simple, reproducible and easy to be controlled process than the preparation of colloidal-gold-modified carbon paste electrodes by mixing a colloidal gold suspension, prepared previously by a time-consuming and delicate procedure [10], and carbon paste.

### 3.5. Measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines using the Tyr-nAu-GCE

The practical usefulness of the Tyr-nAu-GCE was evaluated by estimating the “pool” of polyphenols in wines, which is of interest because of the correlation between wines antioxidant capacity and their polyphenol content. Red and white wines were analyzed following the extremely simple procedure described in Section 2, in which the direct addition of a wine aliquot to the electrochemical cell, and the application of the standard additions method using phenol as the substrate to perform the successive standard additions, were involved. The content of phenolic compounds was then obtained as a phenol concentration, which was further expressed in  $\text{mg l}^{-1}$  of caffeic acid [7]. The estimation of this content must be considered as a bioelectrochemical polyphenol index, because of the different sensitivity observed for each phenolic compound, depending on their structure, with the Tyr-nAu-GCE. This is a common approach to that used with other analytical methodologies [7], although it is obvious that this type of indexes will provide different absolute values depending on the particular analytical methodology applied.

The results obtained with the Tyr-nAu-GCE for three local white wines and three red wines are summarized in Table 3, the values given corresponding to the mean value of five determinations. The same wine samples were also analysed using the spectrophotometric method involving the use of

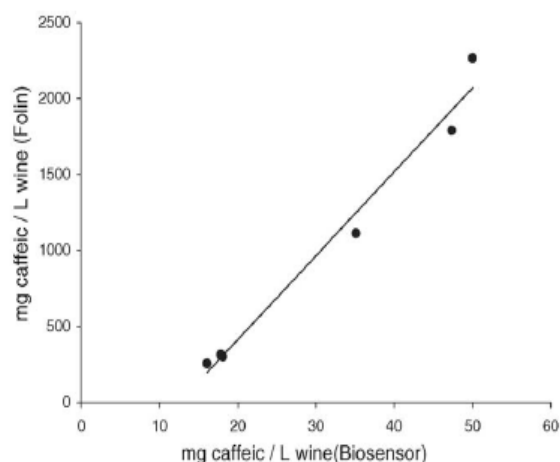


Fig. 6. Correlation between the results obtained for the estimation of the content of phenolic compounds in wines by using the Tyr-nAu-GCE and the Folin-Ciocalteu method.

Folin-Ciocalteu reagent [24]. This reagent by reacting with the phenol  $-\text{OH}$  group, produced a blue coloured complex whose absorbance is read at 730 nm. The total amount of polyphenols is estimated in this method by comparison with a standard solution of caffeic acid. The results obtained are also shown in Table 3.

In spite of the big differences observed for these two polyphenol index values, as a consequence of the completely different analytical methodologies employed, a good correlation was found ( $r = 0.990$ ) when the results obtained with the biosensor were plotted versus the results achieved with the Folin-Ciocalteu method (Fig. 6). This good correlation obtained with different types of wines, which is also kept when caffeic acid was used in the standard additions method instead of phenol as the enzyme substrate, allows the use of the Tyr-nAu-GCE for a rapid and in situ measurement of a bioelectrochemical polyphenol index able to give an estimation of the content of phenolic compounds in wines. Moreover, as expected, important differences in the polyphenol content of red and white wines were found by both methods, which supports the claimed higher antioxidant capacity of red wines.

## 4. Conclusions

Immobilization of tyrosinase by cross-linking onto glassy carbon electrodes modified with electrodeposited gold nanoparticles permits the construction of biosensors which exhibit a good analytical performance (concerning repeatability of the measurements with no need of cleaning pretreatment, stability with time, reproducibility in the construction of different biosensors, and sensitivity) for the amperometric detection of phenolic compounds. These analytical characteristics are similar to those reported in the literature for the tyrosinase bioelectrodes with a claimed better performance for these compounds. The practical usefulness of the Tyr-nAu-GCEs has been demonstrated by the rapid estimation

Table 3  
Estimation of the content of phenolic compounds in wines by using a Tyr-nAu-GCE

Wine	Caffeic acid ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Folin-Ciocalteu method ( $\text{mg l}^{-1}$ caffeic acid)
White “Emparrado”	16.1 ± 0.4	257 ± 9
White “Sotillo”	18 ± 3	303 ± 73
White “Alvear, J. Oro”	18 ± 3	314 ± 15
Red “Añadas de Oro”	47 ± 4	1790 ± 61
Red “San Asensio”	50 ± 4	2266 ± 53
Red “Sotillo”	35 ± 2	1112 ± 78

of the content of phenolic compounds in wines, using an extremely simple procedure involving the direct addition of a sample aliquot to the electrochemical cell.

#### Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Projects BQU 2001-2050 and BQU 2003-00365), and Comunidad de Madrid Project No. 07G/0006/2003 are gratefully acknowledged.

#### References

- [1] C. Védrine, S. Fabiano, C. Tran-Minh, *Talanta* 59 (2003) 535.
- [2] J. Yu, S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 509.
- [3] B. Wang, J. Zhang, S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 397.
- [4] S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F.J. Manuel de Villena, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 187.
- [5] K. Streffer, E. Vijgenboom, A.W.J.W. Tepper, A. Makower, F.W. Scheller, G.W. Canters, U. Wollenberger, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 201.
- [6] Y. Hasebe, K. Yokobori, K. Fukasawa, T. Kogure, S. Uchiyama, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 51.
- [7] L. Campanella, A. Bonami, E. Finotti, M. Tomassetti, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 641.
- [8] N. Peña, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Talanta* 55 (2001) 179.
- [9] S.C. Chang, K. Rawson, C.J. McNeil, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1015.
- [10] S. Liu, J. Yu, H. Ju, *J. Electroanal. Chem.* 540 (2003) 61.
- [11] K.R. Rogers, J.Y. Becker, J. Cembrano, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 4373.
- [12] W.T. Jewell, S.E. Ebeler, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2001) 219.
- [13] J. Wang, F. Lu, D. López, *Biosens. Bioelectron.* 9 (1994) 9.
- [14] B. Serra, S. Jiménez, L. Mena, J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 217.
- [15] P. Önnérjford, J. Emnéus, G. Marko-Varga, L. Gorton, F. Ortega, E. Domínguez, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 607.
- [16] S. Liu, D. Leech, H. Ju, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1.
- [17] E. Katz, I. Willner, J. Wang, *Electroanalysis* 16 (2004) 19.
- [18] S. Liu, H. Ju, *Anal. Biochem.* 307 (2002) 110.
- [19] S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 177.
- [20] M.O. Finot, G.D. Braybrook, M.T. McDermott, *J. Electroanal. Chem.* 466 (1999) 234.
- [21] M.O. Finot, M.T. McDermott, *J. Electroanal. Chem.* 488 (2000) 125.
- [22] K. Yahikozawa, K. Nishimura, M. Kumazawa, N. Tateishi, Y. Takasu, K. Yasuda, Y. Matsuda, *Electrochim. Acta* 37 (1992) 453.
- [23] J. Zhao, J.P. O'Daly, R.W. Henkens, J. Stonehuerner, A.L. Crumbliss, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 493.
- [24] V.L. Singleton, J.A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144.
- [25] C. Nistor, J. Emnéus, L. Gorton, A. Ciucu, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 309.
- [26] V. Carralero Sanz, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis*, in press.
- [27] U. Oesch, J. Janata, *Electrochim. Acta* 28 (1983) 1237.
- [28] B. Serra, E. Mateo, M. Pedrero, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Analysis* 27 (1999) 592.

---

Development of a high analytical performance-  
tyrosinase biosensor based on a composite  
graphite-Teflon electrode modified with gold  
nanoparticles

---

V. Carralero, M.L. Mena, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón

*Biosensors Bioelectronics*

---

22, 730-736 (2006)





## Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite–Teflon electrode modified with gold nanoparticles

V. Carralero, M.L. Mena, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón\*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040-Madrid, Spain*

Received 26 October 2005; received in revised form 25 January 2006; accepted 17 February 2006

Available online 29 March 2006

### Abstract

The design of a new tyrosinase biosensor with improved stability and sensitivity is reported. The biosensor design is based on the construction of a graphite–Teflon composite electrode matrix in which the enzyme and colloidal gold nanoparticles are incorporated by simple physical inclusion. Experimental variables such as the colloidal gold loading into the composite matrix, the enzyme loading and the potential applied to the bioelectrode were optimized. The Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor exhibited suitable amperometric responses at  $-0.10$  V for the different phenolic compounds tested (catechol; phenol; 3,4-dimethylphenol; 4-chloro-3-methylphenol; 4-chlorophenol; 4-chloro-2-methylphenol; 3-methylphenol and 4-methylphenol). The limits of detection obtained were 3 nM for catechol, 3.3  $\mu$ M for 4-chloro-2-methylphenol, and approximately 20 nM for the rest of phenolic compounds. The presence of colloidal gold into the composite matrix gives rise to enhanced kinetics of both the enzyme reaction and the electrochemical reduction of the corresponding *o*-quinones at the electrode surface, thus allowing the achievement of a high sensitivity. The biosensor exhibited an excellent renewability by simple polishing, with a lifetime of at least 39 days without apparent loss of the immobilized enzyme activity. The usefulness of the biosensor for the analysis of real samples was evaluated by performing the estimation of the content of phenolic compounds in water samples of different characteristics.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Tyrosinase biosensor; Gold nanoparticles; Composite electrodes; Phenolic compounds

### 1. Introduction

The use of electrochemical biosensors prepared from phenol oxidases has been shown to be a suitable alternative with respect to conventional well established analytical techniques for the monitoring of phenolic compounds of environmental significance. Advantages such as their simplicity of use, relative low cost and high selectivity and stability have been claimed as reasons for the use of this type of devices for such a purpose (Nistor et al., 1999). In this context, a plethora of enzyme biosensors based on the immobilization of tyrosinase on different electrode materials can be found in recent literature. Thus, glassy carbon electrodes modified with polymers (Védrine et al., 2003), sol–gel materials (Yu et al., 2003; Wang et al., 1994), self-assembled monolayers (SAMs) on gold (Campuzano et al., 2003), Clark's electrodes (Streffler et al., 2001; Hasebe et al.,

1997; Campanella et al., 2004), reticulated vitreous carbon (RVC) (Peña et al., 2001a), screen-printed electrodes (Chang et al., 2002), and carbon paste and other composite materials (Serra et al., 2002; Önnarfjord et al., 1995; Wang et al., 2000) have been used to prepare tyrosinase electrochemical biosensors.

In spite of the big amount of literature on tyrosinase electrochemical biosensors, two general limitations need to be solved yet in order to improve their practical usefulness. One of them concerns the stability of the biosensors. Although many efforts have been made to improve the useful lifetime and reusability of tyrosinase electrodes, searching for appropriate microenvironments for retaining the biological activity of the enzyme, its inherent instability provokes that this useful lifetime is too short for practical applications in many cases. On the other hand, the low concentration levels of phenolic compounds that should be detected due to their classification as priority pollutants, requires that the tyrosinase biosensors are capable to achieve a high sensitivity. These two analytical characteristics for the above-mentioned biosensors reported previously are summarized in Table 1. The aim of this work is the design of a

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944315; fax: +34 91 3944329.  
E-mail address: pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

Table 1  
A comparison of the analytical characteristics of different electrochemical tyrosinase biosensors

Electrode	Sensitivity <sup>a</sup>	LOD ( $\mu\text{M}$ )	$K_M^{\text{app}}$ (M)	Lifetime	Reference
Tyr–PEDT–GCE	$608 \text{ mAM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	0.05		Retains 30% of activity after 12 days	Védrine et al. (2003)
Tyr–sol–gel–TiO <sub>2</sub>	$103 \text{ mAM}^{-1}$	0.1	$2.9 \times 10^{-4}$	Retains 94% of activity after 80 days	Yu et al. (2003)
Tyr–sol–gel–SiO <sub>2</sub>	$23.1 \text{ mAM}^{-1}$	0.1		Retains 73% of activity after 3 weeks	Wang et al. (2000)
Tyr–MPA–AuE	$13.9 \text{ mAM}^{-1}$	0.088	$1.5 \times 10^{-4}$	5 days	Campuzano et al. (2003)
Tyr/GDH–Clark	$6.6 \text{ mAM}^{-1}$ (catechol)	0.01			Streffer et al. (2001)
Tyr–RVC	$8.2 \text{ mAM}^{-1}$	0.26		20 days	Peña et al. (2001a)
Tyr–HRP–SPCE	$1300 \text{ mAM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	0.0025		Retains 92% of activity after 60 days	Chang et al. (2002)
Tyr–graphite–Teflon	$280 \text{ mAM}^{-1}$	0.09	$7.76 \times 10^{-5}$	30 days	Serra et al. (2002)
Tyr–C–epoxy	1.0 (catechol)			30 days	Önnerfjord et al. (1995)
Tyr–CPE	$0.810 \text{ mAM}^{-1}$	15			Wang et al. (1994)
Tyr–Au <sub>coll</sub> –CPE	$23 \text{ mAM}^{-1}$	0.0061	$5.36 \times 10^{-5}$	2 weeks	Liu et al. (2003c)
Tyr–nAu–GCE	$82 \text{ mAM}^{-1}$	0.21	$1.4 \times 10^{-4}$	18 days	Carralero-Sanz et al. (2005)
Tyr–Au <sub>coll</sub> –graphite–Teflon	$540 \text{ mAM}^{-1}$	0.02	$8.9 \times 10^{-6}$	39 days	This work

Unless it is specified, data are given for phenol.

<sup>a</sup> Expressed as the slope of the calibration plot; GCE: glassy carbon electrode; PEDT: poly(3,4-ethylenedioxythiophene); MPA: 3-mercaptopropionic acid; GDH: glucose dehydrogenase; RVC: reticulated vitreous carbon; SPCE: screen printed carbon electrode; CPE: carbon paste electrode.

new tyrosinase bioelectrode able to improve significantly these important analytical characteristics with respect to previous designs.

The new bioelectrode design is based on the combination of the advantageous properties of a graphite–Teflon composite electrode matrix for the immobilization of enzymes, and the use of colloidal gold nanoparticles. In this new design, both the enzyme tyrosinase and gold nanoparticles are incorporated into the composite electrode matrix by simple physical inclusion. The use of graphite–Teflon composite pellets for the construction of enzyme electrodes has been extensively reported by our group (Serra et al., 2001; Guzmán-Vázquez de Prada et al., 2003; Peña et al., 2001b). The resulting bioelectrodes are easily renewable by polishing and allow incorporation of biomolecules and other modifiers with no covalent attachments, thus making the electrode fabrication procedure easy, fast and cheap.

On the other hand, electrochemical biosensors created by coupling biological recognition elements with electrochemical transducers based on or modified with gold nanoparticles are playing an increasingly important role in biosensor research over the last few years (Yáñez-Sedeño and Pingarrón, 2005). So, colloidal gold allows proteins to retain their biological activity upon adsorption (Doron et al., 1995; Brown et al., 1996; Mena et al., 2005), and modification of electrodes with this type of nanoparticles provides a microenvironment similar to that of the redox proteins in native systems, reducing the insulating effect of the protein shell for the direct electron transfer through the conducting tunnels of gold nanocrystals (Liu et al., 2003b). Surface morphology of gold nanoparticles, and the interaction between the nanoparticles and the electrode surface, are significant factors which contribute to improve the electrical contact between the redox protein and the electrode material (Shipway et al., 2000). In this context, biosensors based on the immobilization of enzymes on gold nanoparticles for the determination of hydrogen peroxide, nitrite, glucose and phenols (Tang and Jiang, 1998; Xiao et al., 2000; Gu et al., 2001; Liu and Ju, 2002; Jia et al., 2002; Liu and Ju, 2003a; Liu et al., 2003c; Xiao et al., 2003; Carralero-Sanz et al., 2005) have been recently reported.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

Tyrosinase (from mushroom, EC.1.14.18.1, activity of 2590 units per mg of solid), was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and used as received. Graphite powder (Ultra Carbon, Bay City, MI, USA) and Teflon powder (Aldrich) were used for the fabrication of the composite electrode. An aqueous 1% HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O solution (Sigma, >49% as Au) and 1% sodium citrate solution were used for the preparation of colloidal gold.

$1.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  solutions of catechol (Sigma, 99%), phenol (Sigma, 99%), 3,4-dimethylphenol (Aldrich), 4-chloro-3-methylphenol (Aldrich), 4-chlorophenol (Aldrich), 4-chloro-2-methylphenol (Aldrich, 99%), 3-methylphenol (Aldrich, 99%) and 4-methylphenol (Aldrich, 99%) were prepared in  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4, or in methanol (Scharlab) depending on the solubility of these compounds in water. More diluted standards were prepared by suitable dilution with the  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution. All chemicals were of analytical-reagent grade and the water used was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, NA, USA).

### 2.2. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements in stirred solutions were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab to control the potential values applied. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). A three-electrode cell (a BAS VC-2 10-ml glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode, a BAS MF-2063 Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode and a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon (Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon) biosensor as the working electrode, was used. All experiments were performed at room temperature in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7.4) as the background electrolyte.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Preparation of tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensors

Colloidal gold was prepared according to the procedure described earlier (Mena et al., 2005) by adding 2.5 ml of sodium citrate solution to 100 ml of a boiling aqueous solution containing 1 ml 1% (w/w) HAuCl<sub>4</sub>. The diameter of colloidal gold nanoparticles was  $16 \pm 2$  nm. Preparations were stored in dark glass bottles at 4 °C until use. Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensors were fabricated in the form of cylindrical pellets as follows. Graphite, 150 mg, and 900  $\mu$ l of colloidal gold prepared as described above, were thoroughly mixed by mechanic stirring for 2 h and water was evaporated under air current. Then, 34.75 mg tyrosinase and 400  $\mu$ l of  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution of pH 7.4 were incorporated to the mixture by stirring during 2 h in an ice bath. The resulting mixture was dried and 415.25 mg of Teflon were added and thoroughly hand mixed. The final Teflon percentage (70%) was that shown in earlier works to provide suitable mechanic and conducting characteristics to the composite material (Serra et al., 2002). Then, the mixture was pressed into pellets, by means of a Carver pellet press (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) at  $10,000 \text{ kg cm}^{-2}$  for 10 min. These pellets were 1.3 cm diameter and around 0.4 cm thick. From this mother pellet, several (five or six) 3.0 mm diameter cylindrical portions of each pellet were bored, and each portion was press-fitted into a Teflon holder. Electrical contact was made through a stainless steel screw.

#### 2.3.2. Determination of tyrosinase loading at the electrode surface

Different solutions containing tyrosinase between 0 and 200 enzyme units and  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  L-tyrosine in  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 6.5 were prepared. After 10 min, the absorbance of each solution was measured at 280 nm and a calibration graph was constructed. The enzyme loading at the electrode surface was calculated by immersing the biosensor in a L-tyrosine solution prepared as described above for 10 min. The absorbance was then measured and interpolated into the calibration graph.

#### 2.3.3. Monitoring of phenolic compounds in water samples

The total content of phenolic compounds was estimated in two different water sample matrices. A spring water spiked with  $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$  phenol,  $2.5 \mu\text{mol l}^{-1}$  3,4-dimethylphenol and  $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$  4-chloro-2-methylphenol, and three wastewater samples from a refinery, taken in different days and at different stages of the water effluent purification process, containing unknown amounts of different phenolic compounds. Aliquots of 200  $\mu$ l of undiluted samples were directly added to the electrochemical cell containing 10 ml of  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer solution of pH 7.4, used as supporting electrolyte. Amperometric measurements under constant stirring solutions were performed with the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor by applying a potential of  $-0.10 \text{ V}$  and allowing the steady-state current to be reached. The analysis of samples was carried out by applying the standard additions method by injecting appropriate volumes

of  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  phenol stock solutions prepared in the above-mentioned phosphate buffer. In order to compare the obtained results, the samples were also analysed by applying the standard colorimetric method based on the reaction of phenolic compounds with 4-aminoantipyrine in the presence of potassium ferricyanide to form a coloured compound (APHA, 1981). A calibration plot for phenol ranging between 0.05 and  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  was constructed. Each phenol solution was treated with 1.2 ml of  $0.5 \text{ mol l}^{-1}$  NH<sub>3</sub> aqueous solution, and then the pH was adjusted to  $7.9 \pm 0.1$  with  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer and diluted to 50 ml. The prepared solutions were transferred to 100 ml extraction funnels, and 3.0 ml of 4-aminoantipyrine solution were added. Then, after mixing thoroughly, 3.0 ml of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> solution were added and the reaction was developed for 3 min. The yellow coloured compound formed was immediately extracted in 5 ml CHCl<sub>3</sub>. The organic phases were filtered through a glass-frit filter containing a layer of 5 g of anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance of these solutions was then read at 460 nm in a 1 cm optical path cell. The same procedure was applied to water samples. 1.2 ml of  $0.5 \text{ mol l}^{-1}$  NH<sub>3</sub> aqueous solution were added to 15 ml of sample and the above described procedure was followed. The concentration of phenolic compounds was estimated by interpolation into the calibration plot.

## 3. Results and discussion

As it has been widely described earlier (Nistor et al., 1999), the enzyme reaction with the phenolic compounds involved their catalytic oxidation to the corresponding *o*-quinones, at the expense of reducing oxygen to water. Thus, the electrochemical reduction of these quinones at the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon electrode was used to monitor the enzyme reaction.

Since the fabrication of the modified composite bioelectrode involved the mixture of four components (graphite powder, colloidal gold, Teflon and the biological recognition element), preliminary experiments using phenol as the enzyme substrate were carried out in order to ascertain the appropriate order of incorporation of these components to the electrode matrix. The fabrication procedure described in Section 2 was found to be the most appropriate to get the best analytical performance of the composite biosensor.

### 3.1. Optimization of experimental variables

The effect of colloidal gold loading into the composite electrode matrix was checked by constructing biosensors using different volumes of the colloidal gold dispersion ranging between 225 and 2700  $\mu$ l. The slope value of the corresponding calibration graphs for phenol in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  concentration range obtained with the different biosensors was taken as the selection criterion. Fig. 1 shows that the slope value increased with increasing the volume of the colloidal gold solution up to 900  $\mu$ l, thus suggesting an improvement of the electron transfer kinetics in the presence of gold nanoparticles. However, larger colloidal gold volumes than 900  $\mu$ l produced a decrease of the phenol calibration graph slope value, which is attributed to an

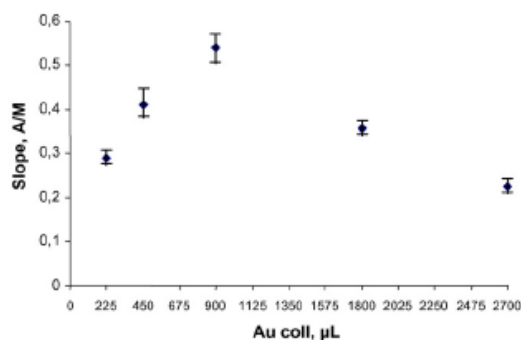


Fig. 1. Effect of the colloidal gold loading into the graphite–Teflon composite electrode matrix on the slope value of the calibration graph for phenol in the  $(1.0\text{--}5.0) \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  concentration range.  $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ ;  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4.

increase in the resistance and double layer capacitance of the modified electrode, as a consequence of the decrease in the ratio of carbon sensing sites in the electrode material similarly to that reported recently for a colloidal gold-modified carbon paste electrode (Liu et al., 2003c).

Concerning tyrosinase loading, the amounts reported in Section 2, yielded 90,000 U per mother pellet, which had been previously optimized for tyrosinase-graphite–Teflon biosensors (Serra et al., 2002). As indicated in Section 2, from one mother pellet, five or six 3.0 mm diameter cylindrical portions were bored; each portion being one working tyrosinase electrode. Assuming that the enzyme is uniformly distributed in the bulk of the electrode material, we calculated the active tyrosinase loading at the bioelectrode surface. Following the procedure described in Section 2.3.2, involving the reaction between tyrosinase and L-tyrosine and the spectrophotometric monitoring of the reaction product (dopachrome), a mean value of  $10 \pm 1$  units was obtained. It should be remarked that this enzyme loading at the electrode surface is more than one order of magnitude lower than that used for the construction of other alternative tyrosinase biosensor designs (Carralero-Sanz et al., 2005; Campuzano et al., 2003).

Fig. 2 shows the effect of the potential applied to the bioelectrode on the amperometric responses from some of the phenolic compounds tested. As can be seen, a similar behaviour was found for all of them, showing an increase of the current from +0.05 V up to  $-0.10 \text{ V}$  and a further decrease for more negative poten-

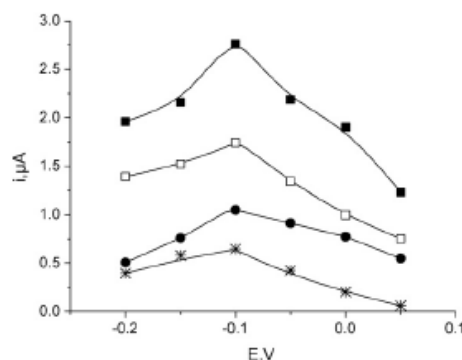


Fig. 2. Influence of the applied potential on the steady-state current for  $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  4-chlorophenol (■),  $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol (●),  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  3,4-dimethylphenol (×), and  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  4-chloro-3-methylphenol (□) at a Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor.

tials. This decrease can be attributed to polymerization reactions of the corresponding *o*-quinones at these negative potentials (Peña et al., 2001a). According to the results shown in Fig. 2, a potential value of  $-0.10 \text{ V}$  was selected for subsequent work.

Under the optimized conditions, the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor exhibited suitable amperometric responses for the different phenolic compounds tested (phenol, catechol, *m*-cresol, *p*-cresol, 4-chloro-3-methylphenol, 4-chloro-2-methyl phenol, 4-chlorophenol and 3,4-dimethylphenol). The steady-state current was reached in approximately 25 s for all these compounds except for 3,4-dimethylphenol, 4-chloro-3-methylphenol and 4-chloro-2-methylphenol, which, as expected, showed a much slower kinetics (approximately 3 min for 3,4-dimethylphenol and 4-chloro-3-methylphenol and almost 9 min for 4-chloro-2-methylphenol).

### 3.2. Analytical characteristics

The analytical characteristics of the calibration plots constructed for the phenolic compounds tested are summarized in Table 2. The limit of detection (LOD) values were calculated according to the  $3s_b/m$  criterion, where  $m$  is the slope of the respective calibration graph, and  $s_b$  was estimated as the standard deviation ( $n=10$ ) of the amperometric signals corresponding to different solutions of the phenolic compound at the lowest concentration level of the respective calibration graph.

Table 2  
Analytical characteristics of the calibration graphs for different phenolic compounds obtained at Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensors

Compound	Linear range (µM)	$r^2$	Slope (mA/M)	LOD (µM)	LOQ (µM)
Catechol	0.010–8.0	0.994	746	0.003	0.01
Phenol	0.025–4.0	0.995	540	0.020	0.06
3,4-Dimethylphenol	0.05–2.0	0.990	563	0.011	0.06
4-Chloro-3-methylphenol	0.03–10.0	0.996	550	0.012	0.04
4-Chlorophenol	0.08–4	0.991	650	0.019	0.07
4-Chloro-2-methylphenol	10–275	0.992	9	3.3	11
3-Methylphenol	0.025–13	0.9995	165	0.014	0.05
4-Methylphenol	0.025–12	0.998	184	0.012	0.04

The limits of quantification (LOQ) were calculated according to the criterion of  $10\times$  standard deviation values. As it can be observed, the LODs obtained for all the phenolic compounds except 4-chloro-2-methylphenol and catechol, were 20 nM or below it. 4-Chloro-2-methylphenol, exhibited the poorest sensitivity due to the hindrance of the enzyme reaction as a consequence of the substitution in the 2-position. On the contrary, catechol exhibited an excellent sensitivity with a LOD value of 3 nM.

The sensitivity achieved with the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor was compared with the data reported for other tyrosinase biosensor configurations (see Table 1). As can be observed, the sensitivity, expressed as the slope of the corresponding calibration plot for phenol, was remarkably higher for the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon configuration (a value of  $7643 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  is obtained by using the geometric surface area of the electrode). It is interesting to remark that the Tyr–graphite–Teflon configuration (Serra et al., 2002) is the second biosensor exhibiting a higher sensitivity. Comparing these two bioelectrode configurations, it can be deduced that the presence of colloidal gold in the composite matrix gave rise to a remarkable increase in the sensitivity. An enhancement in sensitivity provoked by the presence of gold nanoparticles was also observed for tyrosinase biosensors constructed using glassy carbon (Carralero-Sanz et al., 2005) or carbon paste (Liu et al., 2003c) electrodes.

The possibility of that the enhanced sensitivity was due to an improved electrochemical quinone reduction at the electrode surface was evaluated. So, the amperometric response at  $-0.10 \text{ V}$  from 2,4-benzoquinone was measured using a Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon electrode (i.e. with no enzyme) and compared with that obtained at a graphite–Teflon electrode (i.e. unmodified with gold nanoparticles). The quinone reduction current was approximately 2.5-fold larger at the Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon electrode, thus demonstrating that gold nanoparticles enhanced the electrochemical response of the enzyme reaction products.

In order to ascertain whether the biosensor design also produced an increase in the efficiency of the catalytic reaction to form *o*-quinone, we calculated the kinetic parameters of the enzyme reactions for the different phenolic compounds, and the value for phenol was compared with those reported in the literature using other tyrosinase biosensor designs. The enzyme reactions fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, as demonstrated by the parameter “*x*” calculated from the corresponding Hill’s plots ( $[\log(i_{\text{max}}/i) - 1]$  versus the log of the substrate concentration) (Table 3). Therefore, the apparent Michaelis–Menten constants ( $K_M^{\text{app}}$ ) and the maximum rate values of the reaction ( $V_m$ ) were calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plots (see Table 3). As expected, lower  $K_M^{\text{app}}$  values were obtained for the phenolic compounds exhibiting a higher sensitivity at the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon bioelectrode. More interestingly, a comparison of the  $K_M^{\text{app}}$  value for phenol with respect to other values reported in the literature (see Table 1) shows that the Michaelis–Menten constant obtained with the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor is approximately one order of magnitude lower, thus indicat-

Table 3  
Kinetic parameters of the tyrosinase reaction at Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensors

Compound	<i>x</i>	$K_M^{\text{app}}$ (μM)	$V_{\text{max}}$ (μA)
Catechol	0.99	6.6	11.3
Phenol	1.00	8.9	10.9
3,4-Dimethylphenol	1.00	10.2	8.9
4-Chloro-3-methylphenol	0.98	11.3	10.5
4-Chlorophenol	0.99	4.0	5.2
4-Chloro-2-methylphenol	1.08	78.4	1.7
3-Methylphenol	1.11	18.5	4.5
4-Methylphenol	1.00	22.2	7.2

ing a higher affinity of the enzyme for the substrate using this bioelectrode configuration and, consequently, allowing a higher sensitivity.

In conclusion, the presence of colloidal gold into the graphite–Teflon matrix is responsible of an enhanced kinetics both for the enzyme reaction with the phenolic substrates and the electrochemical reduction of the corresponding *o*-quinones at the electrode surface. This combined effect allows the achievement of a remarkably high sensitivity for the phenolic compounds using the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor design.

### 3.3. Stability and reproducibility

An inherent advantage of the biosensor designs based on the use of rigid composite electrodes is their renewability by simple polishing (Serra et al., 2001). Different aspects regarding the stability of the biosensor were considered. Successive amperometric measurements without regeneration of the electrode surface for ten different  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol solutions, yielded a relative standard deviation (R.S.D.) value of the steady state current of 4.8%. Furthermore, the reproducibility of the amperometric response was evaluated after regeneration of the electrode surface by polishing for approximately 5 s on a 150 grit SiC paper. In order to do that, various electrodes were constructed, and measurements of  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  phenol were carried out with the electrodes, each one subjected five times to the regeneration procedure. The R.S.D. values obtained for the steady state currents ranged between 2.8 and 3.6%, thus demonstrating that fresh electrode surfaces were achieved by simple polishing.

The lifetime of one single Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor was checked by performing daily three measurements of a  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol solution prepared also daily. Fig. 3 displays the control chart constructed, taking the mean value of the 10 successive measurements carried out without regeneration of the electrode surface mentioned above as the central value. The upper and lower limits of control were set at  $\pm 3\times$  the standard deviation of this target value. As can be observed, the mean values remained inside the control limits for approximately 25 days with no need to regenerate the electrode surface. After this period of time, when a mean value was below the lower limit of control, the bioelectrode was polished and the signal could then be restored inside the control limits.

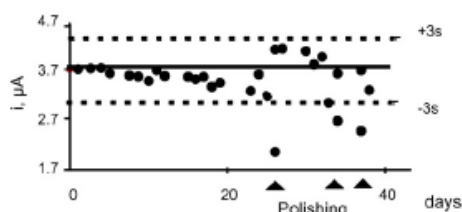


Fig. 3. Control chart constructed for a Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon electrode. Data show the mean values of three measurements from different  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol solutions.  $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ ;  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.4.

This regeneration ability allowed the biosensor to be used for a period of time of at least 39 days without apparent loss of the immobilized enzyme activity.

Finally, the reproducibility of the responses obtained with different Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon electrodes was also evaluated. Amperometric measurements for  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol ( $n=5$ ) were carried out with five different biosensors constructed from the same mother pellet. Each biosensor was subjected to the regeneration procedure and used again to measure other five different  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  phenol solutions. The R.S.D. value obtained for the mean values of the 10 sets of steady state current measurements was of 6.8%. Moreover, when a similar study was performed with two groups of five biosensors, each group constructed from a different mother pellet, the R.S.D. value obtained was of 8.0%. All these results show fairly well that the fabrication procedure of the Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon bioelectrodes is reliable, allowing reproducible amperometric responses to be obtained with different biosensors constructed in the same manner.

The comparison of the lifetime of the Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon biosensor design with other configurations reported in the literature is also made in Table 1. As it can be seen, and although the data relative to the stability of the different biosensors are obtained using methodologies sometimes very different, the lifetime of the Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon electrode is one of the largest. This can be attributed to the combined effect of the regeneration ability of the bioelectrode surface as a consequence of the rigid composite electrode matrix, and to the proved capability of gold nanoparticles to adsorb proteins retaining their biological activity.

Table 4

Estimation of the content of phenolic compounds in water samples by using a Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon electrode ( $n=5$ )

Water sample	Phenol (M)		Phenolic compounds identified by GC-MS
	Biosensor	Standard method	
Spiked spring water	$(3.9 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	Phenol; 3,4-dimethylphenol; 4-chloro-2-methylphenol
Waste water I	$(10 \pm 2) \times 10^{-6}$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	Phenol; 2,4-dimethylphenol; 3,4-dimethylphenol; 2,6-dimethyl-phenol; 3,5-dimethylphenol; 3-ethylphenol
Waste water II	$(6 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(1.20 \pm 0.04) \times 10^{-6}$	Phenol; 3,4-dimethylphenol; 2,6-dimethylphenol
Waste water III	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	

### 3.4. Monitoring of phenolic compounds in waters

The usefulness of the Tyr-Au<sub>colII</sub>-graphite-Teflon electrode for the analysis of real samples was evaluated by performing the estimation of the content of phenolic compounds in water samples of different characteristics. A spring water sample in which the content of phenolic compounds, if existing, was below the detection limit of the method, and three wastewater samples from a refinery, where these compounds are formed as by-product during the crude refining process. These wastewater samples contained unknown amounts of different phenolic compounds (see below). The spring water sample was spiked with  $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$  phenol,  $2.5 \mu\text{mol l}^{-1}$  3,4-dimethylphenol and  $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$  4-chloro-2-methylphenol. As described in Section 2, the samples were analysed in all cases by applying the standard additions method using phenol as the substrate to carry out the successive standard additions. Consequently, the content of phenolic compounds is always expressed as a concentration of phenol that is a phenol index.

The results obtained for the different water samples are summarized in Table 4, the confidence intervals corresponding to a significance level of 0.05. These results were compared with those obtained by applying the standard colorimetric method based on the reaction with 4-aminoantipyrine (APHA, 1981). Moreover, the phenolic compounds present in the water samples were identified by GC-MS. As it is obvious, both methods of analysis gave a different phenol index as a consequence of the different sensitivity achieved for each phenolic compound with each of these methods. So, the phenolic compounds substituted in the para-position (such as 3,4-dimethylphenol and 4-chloro-2-methylphenol) react in a smaller extent or even do not react with 4-aminoantipyrine, as well as the substituted chloro- or nitrophenols (Box, 1983). This can explain the lower concentration of phenol obtained by application of the colorimetric method to samples containing this type of phenolic compounds. On the other hand, the phenolic compounds which have an ortho-position occupied are remarkably less sensitive than the others at tyrosinase biosensors (Serra et al., 2002).

However, when the results obtained with the biosensor were plotted versus the results achieved with the colorimetric method, a linear graph with a good correlation coefficient ( $r^2 = 0.9997$ ) was obtained, independently of the different nature of the water samples coming from a refinery or from

a natural source. This good correlation allows the use of the Tyr–Au<sub>col</sub>–graphite–Teflon biosensor for a rapid and in situ estimation of the content of phenolic compounds in this kind of samples.

#### 4. Conclusions

The combination of the advantageous properties of composite graphite–Teflon electrode matrices for the immobilization of enzymes, and of colloidal gold nanoparticles incorporated into such a matrix allows the development of a tyrosinase biosensor with an improved analytical performance with respect to previous tyrosinase bioelectrode designs. The presence of colloidal gold enhances the kinetics of the reactions involved in the biochemical recognition process and in the electrochemical transduction, and permits to achieve a high sensitivity for the detection of phenolic compounds. Furthermore, the simple renewability of the electrode surface by polishing (when needed), that is an inherent characteristic of the rigid composite bioelectrodes, together with the ability of gold nanoparticles to attach proteins retaining their biological activity, allow the construction of reusable and reproducible biosensors with high stability and long lifetimes.

#### Acknowledgement

Financial support from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU 2003-00365) is gratefully acknowledged.

#### References

- APHA, 1981. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. American Public Health Association, 15th ed., Washington, DC, 1981. p. 1134.
- Box, J.D., 1983. *Water Res.* 17, 511.
- Brown, K.R., Fox, A.P., Natan, M.J., 1996. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 1154–1157.
- Campanella, L., Bonanni, A., Finotti, E., Tomassetti, M., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 19, 641–651.
- Campuzano, S., Serra, B., Pedrero, M., Manuel de Villena, F.J., Pingarrón, J.M., 2003. *Anal. Chim. Acta* 494, 187–197.
- Carralero-Sanz, V., Mena, M.L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2005. *Anal. Chim. Acta* 528, 1–8.
- Chang, S.C., Rawson, K., McNeil, C.J., 2002. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1015–1023.
- Doron, A., Katz, E., Willner, I., 1995. *Langmuir* 11, 1313–1317.
- Gu, H., Yu, A., Chen, H., 2001. *J. Electroanal. Chem.* 516, 119–126.
- Guzmán-Vázquez de Prada, A., Peña, N., Mena, M.L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 18, 1279–1288.
- Hasebe, Y., Yokobori, K., Fukasawa, K., Kogure, T., Uchiyama, S., 1997. *Anal. Chim. Acta* 357, 51–54.
- Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z., Dong, S., 2002. *Anal. Chem.* 74, 2217–2223.
- Liu, S., Ju, H., 2002. *Anal. Biochem.* 307, 110–116.
- Liu, S., Ju, H., 2003a. *Biosens. Bioelectron.* 18, 177–183.
- Liu, S., Leech, D., Ju, H., 2003b. *Anal. Lett.* 36, 1–19.
- Liu, S., Yu, J., Ju, H., 2003c. *J. Electroanal. Chem.* 540, 61–67.
- Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2005. *Anal. Biochem.* 336, 20–27.
- Nistor, C., Emnéus, J., Gorton, L., Ciucu, A., 1999. *Anal. Chim. Acta* 387, 309–326.
- Önnerfjord, P., Emnéus, J., Marko-Varga, G., Gorton, L., Ortega, F., Domínguez, E., 1995. *Biosens. Bioelectron.* 10, 607–619.
- Peña, N., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2001a. *Talanta* 55, 179–187.
- Peña, N., Ruiz, G., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2001b. *Anal. Chem.* 73, 1190–1195.
- Serra, B., Benito, B., Agtíf, L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2001. *Electroanalysis* 13, 693–700.
- Serra, B., Jiménez, S., Mena, M.L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2002. *Biosens. Bioelectron.* 17, 217–226.
- Shipway, A.N., Lahav, M., Willner, I., 2000. *Adv. Mater.* 12, 993–998.
- Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A.W.J.W., Makower, A., Scheller, F.W., Canters, G.W., Wollenberger, U., 2001. *Anal. Chim. Acta* 427, 201–210.
- Tang, F.Q., Jiang, L., 1998. *Ann. NY Acad. Sci.* 864, 538–543.
- Védrine, C., Fabiano, S., Tran-Minh, C., 2003. *Talanta* 59, 535–544.
- Wang, B., Zhang, J., Dong, S., 2000. *Biosens. Bioelectron.* 15, 397–402.
- Wang, J., Lu, F., López, D., 1994. *Biosens. Bioelectron.* 9, 9–15.
- Xiao, Y., Ju, H., Chen, H., 2000. *Anal. Biochem.* 278, 22–28.
- Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J.F., Willner, I., 2003. *Science* 21, 1877–1881.
- Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2005. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 884–886.
- Yu, J., Liu, S., Ju, H., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 19, 509–514.

---

Bioelectrochemical evaluation of the total phenols  
content in olive oil mill wastewaters using a  
tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon biosensor

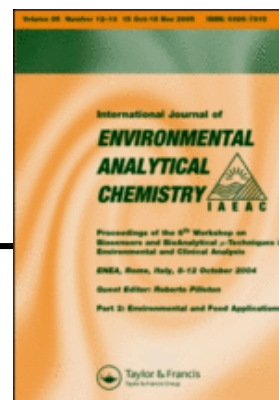
---

M.L. Mena, V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón

*Environmental Analytical  
Chemistry*

---

87, 57-65 (2007)



## Bioelectrochemical evaluation of the total phenols content in olive oil mill wastewaters using a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensor

M. LUZ MENA, VERÓNICA CARRALERO,  
ARACELI GONZÁLEZ-CORTÉS, PALOMA YÁÑEZ-SEDEÑO  
and JOSÉ M. PINGARRÓN\*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,  
University Complutense of Madrid, 28040-Madrid, Spain

(Received 14 February 2006; in final form 12 May 2006)

The use of a robust tyrosinase biosensor, fabricated from graphite–Teflon rigid electrode matrices modified with gold nanoparticles, for the estimation of the total phenols content in olive oil mill wastewaters (OMW), is proposed. The performance of this bioelectrode using both continuous stirring and flow-injection amperometry was studied. A potential value of  $-0.10$  V was selected for the sensitive and stable detection of various phenolic compounds present in OMW samples: catechol, 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 4-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylethanol (tyrosol), and 4-hydroxyphenylpropionic acid. Using catechol as the target phenol, linear calibration graphs were obtained in the  $1.0 \times 10^{-8}$ – $8.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (batch) and  $1.0 \times 10^{-7}$ – $1.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (FI) concentration ranges, with slope values of 750 mA L mol<sup>-1</sup> and 103 mA L mol<sup>-1</sup>, respectively. Batch amperometry was chosen for the analysis of real samples because of its higher sensitivity. For example, the limit of detection for caffeic acid was 80 nM. The ‘pool’ of phenolic compounds was estimated in OMW obtained from different extraction systems and containing phenols at diverse levels of concentration. A comparison of these results with those obtained by applying the Folin–Ciocalteu spectrophotometric reference method was carried out.

*Keywords:* Phenols; Olive oil mill wastewaters; Tyrosinase biosensor; Gold nanoparticles

### 1. Introduction

Biosensors nowadays constitute versatile analytical tools with more and more applications in environmental analysis [1]. This is probably due to the great impact of pollution on human health, and the increasing demand for sensitive and selective methods for the quantitative determination of target analytes [2]. Amperometric biosensors satisfy most of the requirements of modern environmental analytical chemistry, such as low cost, fast response, reliability, simplicity, and stability. An additional advantage resides in their use for *in situ* monitoring. So, for example,

\*Corresponding author. Fax: +34-91-3944329. Email: pingarro@quim.ucm.es

many applications of amperometric enzyme biosensors for water analysis have been focused on real-time detection of compounds with environmental relevance [3, 4].

Olive oil mill wastewater (OMW) is produced by the olive oil extraction industry and is a strong pollutant mainly because of the high concentration of phenolic compounds, which are phytotoxic and also resistant to biological degradation treatments [5]. Environmental contamination from OMW can be produced when the liquid from the extraction process is discharged to the soil or into a water stream. This becomes a major environmental problem in the main olive-producing countries of the Mediterranean region [6]. Several analytical methods involving techniques such as HPLC [7, 8], LC-MS [9], GC-MS [10, 11], and capillary electrophoresis [12] have been reported for the determination of phenolic compounds in olive oil and related products, including residues. However, there is still a demand for relatively simple analytical devices suitable for screening and rapid assays of the total content of this type of compound in complex real samples. In this work, we propose the use of a robust tyrosinase amperometric composite biosensor for the evaluation of the polyphenols content in OMW.

Tyrosinase carbon paste electrodes have been prepared since the early 1990s [13–16]. The analytical performance of these biosensor designs can be improved by using rigid composite electrode matrices, such as matrices composed of graphite and Teflon, into which the enzyme is incorporated by simple physical inclusion [17]. The resulting bioelectrodes are easily renewable by polishing and permit the incorporation of modifiers to the electrode matrix to enhance the analytical properties of the biosensors. In this context, we recently described a new tyrosinase biosensor design based on the construction of a graphite–Teflon composite electrode matrix in which the enzyme and colloidal gold nanoparticles were incorporated by physical inclusion [18]. The analytical performance of this new biosensor design was checked for catechol, phenol, 3,4-dimethylphenol; 4-chloro-3-methylphenol; 4-chlorophenol, 4-chloro-2-methylphenol; 3-methylphenol and 4-methylphenol. Gold nanoparticles allow proteins to retain their biological activity upon adsorption, and improve the kinetics of the reactions involved in the biochemical recognition process and in the electrochemical transduction, thus yielding a high sensitivity for the detection of phenolic compounds.

In this work, we describe an application of the tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensor for a bioelectrochemical evaluation of the total phenolic compounds content in a complex real environmental sample such as OMW. In order to do this, the operational performance of the biosensor for different phenolic compounds, which are currently present in OMW (catechol; 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 4-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylethanol (tyrosol), and 4-hydroxyphenyl-propionic acid) is evaluated both in batch amperometry and flow injection with amperometric detection. Furthermore, the results obtained were compared with those achieved by applying the reference Folin–Ciocalteu method.

## 2. Experimental

### 2.1 Apparatus and electrodes

Amperometric measurements under batch conditions (i.e. in stirred solutions) were carried out with an ECO Chemie Autolab PGSTAT 10 potentiostat using the software

package GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System). A P-Selecta Agimatic magnetic stirrer was also used. A three-electrode cell (a BAS VC-2 10-mL glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode, a BAS MF-2063 Ag/AgCl/3M KCl reference electrode and a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon (Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon) biosensor as the working electrode, was used. The flow-injection arrangement consisted of a Gilson Minipuls-2 peristaltic pump and a Rheodyne 7725i valve. Electrode potentials were controlled by means of a  $\mu$ -Autolab (ECO Chemie) potentiostat, using the GPES 4.7 software. A Metrohm EA 1096 wall-jet cell equipped with an Ag/AgCl/3M KCl reference electrode and a gold counter electrode was also used.

## 2.2 Reagents and solutions

Tyrosinase (from mushrooms, EC.1.14.18.1, activity of 2590 units per mg of solid) was purchased from Sigma (St. Louis, MO) and used as received. Graphite powder (Ultra Carbon, Bay City, MI) and Teflon powder (Aldrich) were used for the fabrication of the composite electrode. An aqueous 1% H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O solution (Sigma, >49% as Au) and 1% sodium citrate solution were used for the preparation of colloidal gold.

Stock 0.1 mol L<sup>-1</sup> solutions of phenolic compounds from Aldrich: catechol, 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 4-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylethanol (tyrosol), and 4-hydroxyphenylpropionic acid were prepared daily by dissolving the appropriate amount in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer of pH 7.4, or in methanol (Scharlab), depending on the solubility of these compounds in water. More diluted standards were prepared by suitable dilution with the 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, which was also used as the supporting electrolyte in batch amperometric measurements, and as the carrier solution under flow-injection conditions.

**2.2.1 Samples.** OMW samples containing phenolic compounds at diverse concentration levels came from three olive oil cooperatives in Spain (Almendralejo, Badajoz; Martos, Jaén and Villarejo de Salvanes, Madrid). Olive oil was extracted using a centrifugation process in the case of Martos (sample 1), Villarejo, and Almendralejo samples, and a pressing discontinuous process in the case of Martos 2 and 2a–c samples. All samples corresponded to the 2004–2005 harvest season.

## 2.3 Procedures

**2.3.1 Preparation of tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensors.** Prior to the fabrication of the biosensor, colloidal gold nanoparticles of  $16 \pm 2$  nm in diameter were prepared by adding 2.5 mL of sodium citrate solution to 100 mL of a boiling aqueous solution containing 1 mL 1% (w/w) H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>. Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensors were fabricated in the form of cylindrical pellets as described earlier [18]. Briefly, graphite, 150 mg, and 900  $\mu$ L of colloidal gold were thoroughly mixed by mechanic stirring for 2 h, after which water was evaporated under air current. Then, 34.75 mg of tyrosinase and 400  $\mu$ L of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution, pH 7.4, were

incorporated to the mixture by stirring for 2 h in an ice bath. The resulting mixture was dried, and 415.25 mg of Teflon was added and thoroughly hand-mixed. Then, the mixture, which contained 70% Teflon, was pressed into pellets, by means of a Carver pellet press (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) at  $10\,000\text{ kg cm}^{-2}$  for 10 min. Five or six 3.0 mm cylindrical portions of this main pellet were bored, and each portion was press-fitted into a Teflon holder. Electrical contact was made through a stainless steel screw.

**2.3.2 Evaluation of the phenols content in OMW.** An appropriate aliquot of homogenized sample was diluted to 10 mL with phosphate buffer solution of pH 7.4 and transferred to the electrochemical cell. Amperometric measurements in stirred solutions at  $-0.1\text{ V}$  using the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon were carried out by recording the current and allowing the steady state to be reached. The content of phenolic compounds was estimated by applying the standard additions method, which implied the addition of five successive 20  $\mu\text{L}$  aliquots from a caffeic acid stock solution.

As a reference method, the samples were also analysed by means of the spectrophotometric method involving the use of Folin–Ciocalteu reagent [19]. In this method, 4.2 mL of deionized water and 0.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (phosphotungstic-phosphomolybdic acid) were added to a 0.5 mL aliquot of sample previously diluted with deionized water. The mixture was stirred for 1 min, and 1.0 mL of an 80% sodium carbonate solution and 4.2 mL of deionized water were added. The resulting solution was allowed to stand for 2 h at room temperature in darkness, and then the absorbance was read at 730 nm. The absorbance value was interpolated into a calibration plot for caffeic acid constructed with standard solutions of this compound in the  $2.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  concentration range, which were subjected to the same procedure.

### 3. Results and discussion

As has been widely reported, the tyrosinase enzyme reaction with phenolic compounds involved the catalytic oxidation of these compounds to their corresponding *o*-quinones [20]. The electrochemical reduction of these quinones at the modified electrode by transferring two electrons and two protons was used to monitor the enzyme reaction.

#### 3.1 Operational performance of the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor for phenolic compounds currently present in OMW

The composition of the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon bioelectrodes, as well as the potential value to be applied for the amperometric detection of the different phenolic compounds which are currently present in OMW, were the same than those used for other phenolic compounds in reference [18]. The analytical characteristics of the calibration plots constructed by batch amperometry for catechol, 3,4-dihydroxycinnamic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylethanol, and 4-hydroxyphenylpropionic acid, are summarized in table 1. The limits of detection were calculated according to the  $3s_b/m$  criterion, where  $m$  is the slope value of the corresponding calibration graph, and  $s_b$  was estimated as the standard

Table 1. Analytical characteristics of the calibration graphs and kinetic parameters for different phenolic compounds currently present in OMW, obtained by amperometry in stirred solutions at  $-0.1$  V with Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensors.

Phenolic compound	Slope (mA M <sup>-1</sup> )	Linear range (μM)	LOD <sup>a</sup> (μM)	$K_M^{app}$ (μM)	$V_{max}$
Catechol	746 ± 42	0.01–8.0	0.003	6.6	11.3
3,4-Dihydroxycinnamic acid	43 ± 6	0.2–70	0.08	64	5.3
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	39 ± 6	0.2–100	0.09	250	14
4-Hydroxyphenylacetic acid	56 ± 6	0.1–100	0.05	79	8
4-Hydroxyphenylethanol	43 ± 2	0.2–100	0.08	45	9
4-Hydroxyphenylpropionic acid	31 ± 5	0.5–7	0.02	215	16

<sup>a</sup>  $3s_b/m$ .

deviation ( $n=10$ ) of the amperometric signals from different solutions of the compounds at the lowest concentration level of the respective calibration plot. As expected for a tyrosinase biosensor, the highest sensitivity observed was for catechol, whereas the presence of carboxylic or hydroxy- substituents in the fourth position of the aromatic ring resulted in a considerable decrease in sensitivity for the other phenolic compounds tested. Nevertheless, it should be remarked that the detection limits obtained for these compounds are considerably better than those achieved for the same compounds with other biosensor configurations using phenol oxidases [21, 22]. For example, the detection limit for caffeic acid, 80 nM, is sevenfold lower than that obtained using a laccase biosensor constructed by adsorption of the enzyme on a graphite electrode, even though this compound is one of the most sensitive substrates of laccase [23].

All the enzyme reactions for the different phenolic compounds obeyed a Michaelis-Menten type kinetics, as demonstrated by calculating the 'x' parameter from the corresponding Hill plots [ $\log(i_{max}/i) - 1$ ] vs. the log of the substrate concentration, which ranged between 0.995 and 1.12. Consequently, the apparent Michaelis-Menten constants ( $K_M^{app}$ ) and the maximum rate values of the reaction ( $V_m$ ) were calculated from the corresponding Lineweaver-Burk plots (see table 1). As expected, the lowest  $K_M^{app}$  value was obtained for catechol, which exhibited the highest sensitivity at the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon bioelectrode. This value was remarkably lower than those reported previously in the literature [18]. Furthermore, the  $K_M^{app}$  value obtained for caffeic acid was also one order of magnitude lower than that reported in the literature [22].

The performance of the enzyme electrode was also evaluated under flow-injection conditions. In this case, the influence of the applied potential on the amperometric response was checked by injection of 160 μL of a  $1.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> catechol solution into the carrier solution consisting of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer of pH 7.4. As can be observed in figure 1, the peak current increased from +0.20 V up to -0.10 V, following which a decrease was observed for more negative potentials, which can be attributed to polymerization of the corresponding *o*-quinones at these negative potentials [24]. Therefore, according to these results, a potential of -0.10 V was selected again for the amperometric detection.

Characteristic flow-injection parameters, such as flow rate and sample volume injected, were also optimized. Concerning flow rate, its influence on peak current signals was investigated in the 0.30–1.35 mL min<sup>-1</sup> range. The results showed a peak current maximum at 0.4 mL min<sup>-1</sup> and then a slight decrease in the response with flow

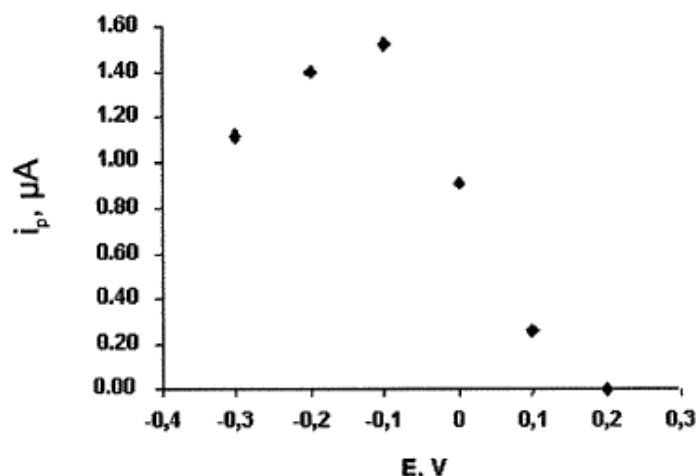


Figure 1. Influence of applied potential on the steady-state current for  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  catechol at a Tyr-Au<sub>colI</sub>-graphite-Teflon biosensor.

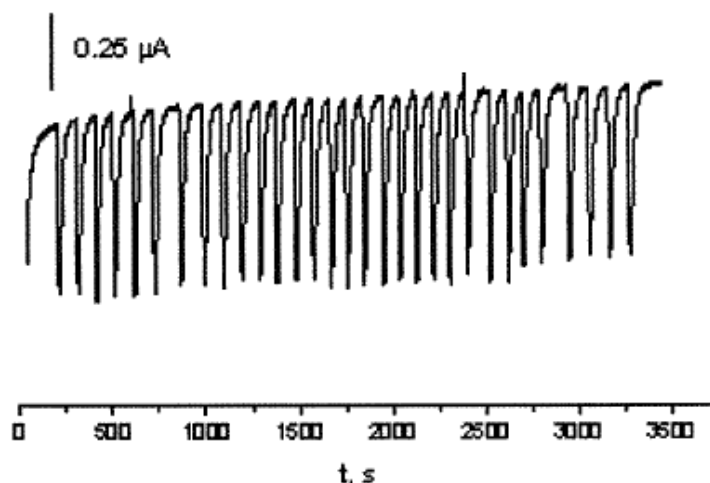


Figure 2. Response to successive  $160 \mu\text{L}$  injections of  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  catechol solution in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solutions of pH 7.4 at a Tyr-Au<sub>colI</sub>-graphite-Teflon biosensor.  $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ .

rate. A similar behaviour was observed for a graphite laccase biosensor using the same wall-jet flow cell configuration, which agrees with a highly kinetic control of the response [23]. Further studies were carried out at a flow rate of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ . On the other hand, a sample volume of  $160 \mu\text{L}$  was chosen as the injection volume taking into account the  $i_p/W_{1/2}$  ratio, where  $W_{1/2}$  is the peak width at half height. Using these experimental conditions, a good repeatability of the FI responses was observed. As an example, figure 2 shows amperometric signals from 30 successive injections of  $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  catechol solutions, yielding a RSD value for  $i_p$  of 3.7%.

Linear calibration graphs were obtained for both catechol and caffeic acid over the concentration ranges  $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r=0.996$ ) and  $2.0 \times 10^{-6} - 6.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r=0.998$ ), respectively, with slope values of  $103 \text{ mA M}^{-1}$  and  $7.5 \text{ mA M}^{-1}$ , respectively. As expected, the sensitivity obtained for these compounds was notably lower than that achieved using batch amperometry at the same detection potential (see table 1).

### 3.2 Evaluation of the total phenols content in OMW

The developed Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor was used for the rapid bioelectrochemical evaluation of the phenols content in OMW. This complex type of sample contains a variable number of organic compounds which are present at different concentration levels, and exhibit different properties such as volatility, solubility, etc. Moreover, OMW contain high concentrations of salts, lipids, pectins and polysaccharides, and show high BOD and COD levels. All these characteristics make evident the difficulties associated with the analysis of these samples.

Batch amperometry in stirred solutions was used for the analysis of OMW due to the extremely simple experimental procedure needed, which involved the direct addition of a diluted sample aliquot to the electrochemical cell and the application of the standard additions method using caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) as the standard (see section 2). This compound was selected to express the total phenols content, as it is made in the Folin–Ciocalteu reference method [20], thus allowing a direct comparison of the results obtained by both methods. Table 2 summarizes the results obtained from five replicates of each sample, the confidence intervals being calculated for a significance level of 0.05. As can be observed, samples Martos 2 and Martos 2a, b and c, which corresponded to an olive oil extraction process by pressing, exhibited a higher phenols content. This type of extraction process provides a dry solid residue, and a mixture of oil and water which is introduced into decantation wells until phase separation occurs. The samples analysed were waters from this type of well. In contrast, samples obtained from a three-phases centrifugation system (Villarejo and Badajoz), involving the addition of water during the extraction process, thus generating high volumes of OMW, yielded lower phenolic compound contents. Finally, the sample called Martos 1, which was obtained from a two-phase centrifugation system, producing olive oil and wet solid residue without water addition, gave an intermediate concentration of phenols. The latter is an ecologically attractive process [7] because of the lower volume of waste. It is important to point out that, in spite of the differences in the origin and concentration levels of phenolic compounds between the samples analysed, similar slope values, ranging between 13 and 17 mA M<sup>-1</sup>, were obtained in all cases from the calibration plots constructed by applying the standard additions method. The existence of a matrix effect was demonstrated by comparison of these slope values with that given in table 1 for caffeic acid (43 mA M<sup>-1</sup>), using standard solutions.

Table 2. Estimation of the content of phenolic compounds<sup>a</sup> in OMW samples by batch amperometry using a Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor.

Sample	Biosensor	Folin–Ciocalteu
Badajoz	0.255 ± 0.002	0.270 ± 0.009
Martos 1	0.416 ± 0.002	0.352 ± 0.005
Martos 2	3.5 ± 0.7	7.2 ± 0.5
Villarejo	0.22 ± 0.03	0.58 ± 0.02
Martos 2a	1.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2
Martos 2b	1.7 ± 0.3	2.4 ± 0.2
Martos 2c	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1

<sup>a</sup> As caffeic acid in g L<sup>-1</sup>:  $x \pm (ts/\sqrt{n})$  ( $n = 5$ )

As commented above, the results obtained using the biosensor were compared with those achieved by applying the reference spectrophotometric method involving the use of Folin–Ciocalteu reagent (table 2). Both sets of results must be considered as phenols indexes since both methods yield responses for these compounds whose sensitivity depends markedly on their structure. Therefore, it was expected that the values given in table 2 as ‘estimations of the content of phenolic compounds’ will be different to some extent, as a consequence of the completely different analytical methodologies employed. Nevertheless, from a rough comparison of the indexes for both methods, it can be deduced that the values are rather similar for a given sample. When the results obtained with the biosensor were plotted vs. the results obtained with the Folin–Ciocalteu method, a linear plot with a remarkably good correlation coefficient ( $r=0.996$ ) and an intercept including zero ( $0.1 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$  of caffeic acid) were found. These results indicated that no systematic errors exist in any of the two methods. Although, as expected considering the different values for the phenolic compounds indexes obtained by the two methods, the slope of such a linear plot was far from the unity ( $m=0.54 \pm 0.09$ ), the correlation results reveal that the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor can be used for the rapid and easy evaluation of the total phenolic compounds content in this type of complex sample.

#### 4. Conclusions

This study has demonstrated the possibility of using a robust tyrosinase composite biosensor, into which colloidal-gold nanoparticles have been incorporated, for rapid and *in situ* bioelectrochemical evaluation of the phenolic compounds content in a complex real environmental sample such as olive oil mill wastewaters. The proposed analytical methodology, which can be implemented using both batch amperometry in stirred solutions and flow injection with amperometric detection, exhibits several important practical advantages with respect to the Folin–Ciocalteu reference method. The most important is the simplicity of the sample treatment, involving only the direct addition of a diluted sample aliquot to the electrochemical cell, which dramatically reduces the time required for the analysis. Thus, by applying the batch amperometric method, the time of analysis for an OMW sample is of approximately 5 min, in contrast to the 2.5 h needed when the Folin–Ciocalteu method is used. Dark and cloudy samples containing oil residues can also be directly analysed. Moreover, the use of an enzyme biosensor ensures a high selectivity, in contrast to the Folin–Ciocalteu method where other compounds can produce positive interferences.

#### Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU 2003-00365) and PR27/05-13860-BSCH is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi. *Sens. Actuators B*, **102**, 179 (2004).

- [2] J. Parellada, A. Narvaez, M.A. Lopez, E. Dominguez, J.J. Fernandez, V. Pavlov, I. Katakis. *Anal. Chim. Acta*, **362**, 47 (1998).
- [3] I. Karube, Y. Nomura, Y. Arikawa. *Trends Anal. Chem.*, **14**, 295 (1995).
- [4] I. Karube, Y. Nomura. *J. Mol. Catal. B*, **10**, 177 (2000).
- [5] E.S. Aktas, S. Imre, L. Ersoy. *Wat. Res.*, **35**, 2336 (2001).
- [6] A. D'Annibale, C. Crestini, V. Vinciguerra, G. Giovannozzi-Semanni. *J. Biotechnol.*, **61**, 209 (1998).
- [7] L. Lesage-Meesen, D. Navarro, S. Maunier, J-C. Sigoillot, J. Lorquin, M. Delattre, J-L. Simon, M. Asther, M. Labat. *Food. Chem.*, **75**, 501 (2001).
- [8] A. Bendini, M. Bonoli, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, T.G. Toschi. *J. Chromatogr. A*, **985**, 425 (2003).
- [9] J. Vial, M.C. Hennion, A. Fernández-Alba, A. Agüera. *J. Chromatogr. A*, **937**, 21 (2001).
- [10] F. Angerosa, N. d'Alessandro, F. Corana, G. Mellerio. *J. Chromatogr. A*, **736**, 195 (1996).
- [11] J.J. Ríos, M.J. Gil, F. Gutiérrez-Rosales. *J. Chromatogr. A*, **1093**, 167 (2005).
- [12] F. Priego-Capote, J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro. *J. Chromatogr. A*, **1045**, 239 (2004).
- [13] J. Wang, F. Lu, S.A. Kane, Y.K. Choi, M.R. Smyth, K. Rogers. *Electroanalysis*, **9**, 1102 (1997).
- [14] K.R. Rogers, J.Y. Becker, J. Cembrano, S.H. Chough. *Talanta*, **54**, 1059 (2001).
- [15] M. Lutz, E. Burestedt, J. Emnéus, H. Liden, S. Gobhadi, L. Gorton, G. Marko-Varga. *Anal. Chim. Acta*, **305**, 8 (1995).
- [16] J. Wang, J. Liu. *Anal. Chim. Acta*, **284**, 385 (1993).
- [17] B. Serra, S. Jiménez, M.L. Mena, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 217 (2002).
- [18] V. Carralero, M.L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* (In press).
- [19] V.L. Singleton, J.A. Rossi. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144 (1956).
- [20] C. Nistor, J. Emnéus, L. Gorton, A. Ciucu. *Anal. Chim. Acta*, **387**, 309 (1999).
- [21] M.L. Mena, V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón. *Electroanalysis*, **17**, 2099 (2005).
- [22] A. Jarosz-Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton. *Talanta*, **66**, 1219 (2005).
- [23] B. Haghghi, L. Gorton, T. Ruzgas, L.J. Jönsson. *Anal. Chim. Acta*, **487**, 3 (2003).
- [24] N. Peña, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón. *Talanta*, **55**, 179 (2001).

---

# Development of a Progesterone Immunosensor Based on a Colloidal Gold-Graphite-Teflon Composite Electrode

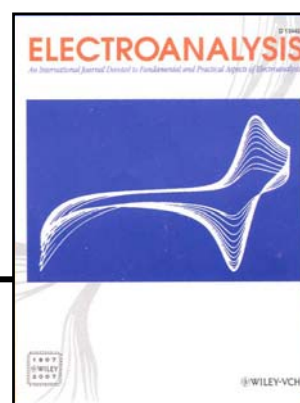
---

V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón

*Electroanalysis*

---

19, 853-858 (2007)



## Full Paper

## Development of a Progesterone Immunosensor Based on a Colloidal Gold-Graphite-Teflon Composite Electrode

V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón\*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid. 28040-Madrid, Spain

\*e-mail: pingarro@quim.ucm.es

Received: October 3, 2006

Accepted: November 20, 2006

### Abstract

A novel amperometric immunosensor for the determination of progesterone, based on direct attachment of antiprogestosterone on a gold nanoparticles-modified graphite-Teflon composite electrode is reported. Competitive assay involving progesterone labeled with alkaline phosphatase (AP), and 1-naphthyl phosphate as the enzyme substrate, was employed. The product of the enzyme reaction, 1-naphthol was detected amperometrically at +0.3 V vs. Ag/AgCl. Variables involved in the immunosensor preparation such as the colloidal gold loading and the amount of anti-Prog immobilized, as well as in the immunosensing event (pH, Prog/Prog-AP ratio and volume) were optimized. A calibration plot was obtained for progesterone with a linear range between 0 and 30 ng mL<sup>-1</sup>, and a slope value, -1.2 nA ng<sup>-1</sup> mL, which is remarkably higher than that reported for other progesterone biosensors. A good repeatability of the amperometric measurements, *RSD* = 3.5% (*n* = 10), and an acceptable fabrication reproducibility, *RSD* = 8.2% (*n* = 3), were obtained. The developed anti-Prog-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon immunosensor was applied to the progesterone determination in milk. Recovery at the 3.5 ng mL<sup>-1</sup> progesterone concentration level was of 101 ± 6% (*n* = 7).

**Keywords:** Electrochemical immunosensor, Gold nanoparticles, Composite electrodes, Progesterone

DOI: 10.1002/elan.200603794

### 1. Introduction

Voltammetric detection methods for immunoassays have been developed since more than 20 years [1, 2]. In particular, electrochemical immunosensors combine selectivity of the antibody-antigen recognition processes with the excellent capabilities of electrochemical transduction such as sensitivity, low cost, speed of analysis and possibility of portable screening. Of course, immobilization of immunoactive compounds on the electrode surface without significant losses of their activity and stability is an important goal to achieve in the preparation of immunosensors. In this context, the use of gold nanoparticles has demonstrated to be a useful tool for the development of electrochemical immunosensors. As it is well known, biological molecules retain their activity when adsorbed on gold nanoparticles [3]. Modification of electrodes with these nanoparticles provides a microenvironment similar to that of the proteins in native systems, with gold nanocrystals acting as conducting tunnels and facilitating electron transfer [4, 5]. In fact, very recently, various configurations of electrochemical immunosensors using gold nanoparticles have been reported. Amperometric enzyme immunosensors have been developed for the detection of  $\alpha$ -1-fetoprotein based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and thionine on a Nafion modified electrode by electrostatic adsorption [6]. Gold nanoparticles supported on a glassy carbon

electrode modified with toluidine blue-polysulfanilic acid have been also used for the construction of an amperometric immunosensor for determination of carcinoembryonic antigen [7]. Furthermore, an electrochemical immunoassay for carcinoma antigen-125 based on antigen immobilization on colloidal gold stabilized with cellulose acetate membrane on a glassy carbon electrode has been reported [8]. Moreover, various immunosensor designs prepared from hybrid materials such as sol-gel and/or self-assembled monolayers and gold nanoparticles, which exhibit high sensitivity and long-term stability, have been also recently reported [9–12].

On the other hand, colloidal gold-graphite-Teflon composites have demonstrated to be an excellent material for the preparation of biosensors [13]. Gold nanoparticles and biomolecules can be incorporated into the graphite-Teflon matrix by simple physical inclusion, thus making the electrode fabrication procedure easy, fast and cheap, and giving rise to bioelectrodes easily renewable by polishing. Until now, no electrochemical immunosensors based on this type of configuration are found in the literature, although an immunosensor based on a thionine and gold nanoparticles-modified carbon paste electrode has been reported very recently [14].

Monitoring of progesterone levels in cow's milk has a great interest because it constitutes a reliable approach to predict ovulation, and to detect pregnancy and fertility problems [15]. Electrochemical biosensors for progesterone using screen-printed carbon electrodes (SPCE) coated with

immunoglobulin G (IgG) to capture and orientate antiprogestosterone antibodies, and using competitive immunoassay with alkaline-phosphatase-labeled progesterone have been described [15, 16–18].

In this paper, a novel electrochemical immunosensor for the determination of progesterone is reported. The approach combines the use of gold nanoparticles and graphite-Teflon composite electrodes with the direct attachment of anti-Prog to the electrode surface.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and Solutions

Monoclonal antiprogestosterone (anti-Prog) was purchased from Sigma. Progesterone labeled with alkaline phosphatase (AP-prog) was obtained from Ridgeway Science Ltd. (Alvington, Gloucestershire, UK). Unlabeled progesterone (Aldrich, 98%) and 1-naphtyl phosphate monosodium salt monohydrate (Fluka, >98%) were also used. Bovine serum albumin (BSA) (97%), 1-naphtol (99%), magnesium chloride (99%) and diethanolamine (DEA) (98%) were all from Merck. A stock 1 mM solution of progesterone was prepared in methanol and stored at 4°C. More diluted solutions were prepared daily by dilution with 0.1 M diethanolamine – HCl (pH 7.2) buffer solution. 0.01 M solutions of 1-naphtol were also prepared daily in 0.1 M diethanolamine – HCl (pH 7.2) buffer solution.

Colloidal gold was prepared by adding 2.5 mL of 1% sodium citrate solution to 100 mL of a boiling aqueous solution containing 1 mL 1% (w/w) HAuCl<sub>4</sub> (Sigma, >49% as Au) [19]. The diameter of gold nanoparticles was 16 ± 2 nm. Graphite powder (Ultra Carbon, Bay City, MI, USA) and Teflon powder (Aldrich) were also used for the preparation of the composite electrode.

### 2.2. Apparatus and Electrodes

All electrochemical measurements were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B. V.). A three-electrode cell (a BAS VC-2 10-mL glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode, a BAS MF-2063 Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode, and the anti-Prog-colloidal gold-graphite-Teflon (anti-Prog-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon) immunosensor as the working electrode, were used. All experiments were performed at room temperature.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Preparation of the Au<sub>col</sub>-Graphite-Teflon Electrode

The composite gold nanoparticle electrode was fabricated as described previously [13]. Briefly, 150 mg of graphite and

900 µL of colloidal gold were thoroughly mixed by mechanic stirring for 2 h. Then, water was evaporated under air current at room temperature. Next, 450 mg of Teflon powder were added and thoroughly mixed by hand. Then, the mixture was pressed into pellets, by means of a Carver pellet press (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) at 10 000 kg cm<sup>-2</sup> for 10 min. These pellets were 1.3 cm diameter and around 0.4 cm thick. From this main pellet, several (five or six) 3.0 mm diameter cylindrical portions of each pellet were bored, each portion of them constituting a different composite electrode. Each electrode was press-fitted into a Teflon holder, and the electrical contact was made through a stainless steel screw.

#### 2.3.2. Immunosensor Preparation

5 µL of a 0.5 µg mL<sup>-1</sup> anti-Prog solution was deposited on the Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon electrode surface and allowed to dry at air under room temperature. Then, the modified electrode was immersed for five minutes into a 2% (w/w) BSA solution prepared in 0.1 M diethanolamine (DEA) - HCl buffer solution of pH 7.2, and washed carefully with a DEA buffer solution of pH 10.0.

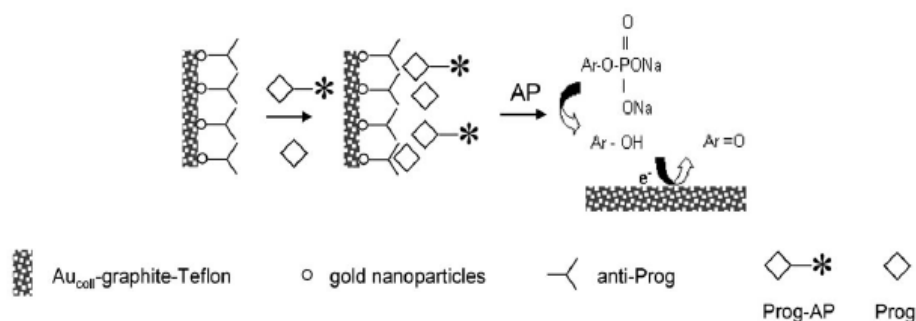
#### 2.3.3. Progesterone Electrochemical Detection

The electrochemical detection of progesterone was carried out by depositing 8 µL of the appropriate 5:3 (v/v) Prog AP: Prog solution on the immunosensor surface. After drying for two hours at room temperature (or overnight at 4°C), the immunosensor with the immunoconjugate layer was immersed into the electrochemical cell which contained 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 M diethanolamine - HCl buffer solution of pH 10.0. Then, 500 µL of 0.1 M 1-naphtyl phosphate were added and the amperometric measurements of the oxidation current from 1-naphtol were carried out at +0.3 V vs. Ag/AgCl.

## 3. Results and Discussion

As it is depicted in Scheme 1, the immunosensor was based on a competitive assay in which the analyte Prog and the antigen labeled with the enzyme alkaline phosphatase (AP), compete for the binding sites of the immobilized antibody. Different enzymatic hydrolysis products, phenol, *p*-nitrophenol and 1-naphtol, from their respective phosphate derivatives used as AP substrates, were firstly checked to monitor the antibody-antigen binding. Figure 1 shows the effect of the applied potential on the amperometric oxidation responses of phenol, *p*-nitrophenol and 1-naphtol at the Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon electrode. As it can be seen, the 1-naphtol oxidation occurred at less positive potentials and with a similar sensitivity that those observed for the other compounds. Consequently, 1-naphtyl phosphate was selected as the enzyme substrate for further work.

Figure 2 shows cyclic voltammograms registered for 1-naphtol at the colloidal gold modified electrode and at a



Scheme 1. Schematic diagram of the progesterone immunosensor based on electrochemical detection at a Au<sub>colloid</sub>-graphite-Teflon electrode using competitive assay; AP: alkaline phosphatase; Prog: progesterone; ArOH: 1-naphtol.

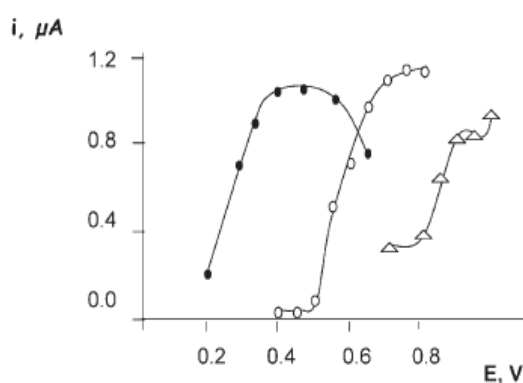


Fig. 1. Effect of the applied potential on the amperometric oxidation of  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (●) 1-naphtol; (○) phenol; (Δ) *p*-nitrophenol at a Au<sub>colloid</sub>-graphite-Teflon electrode.

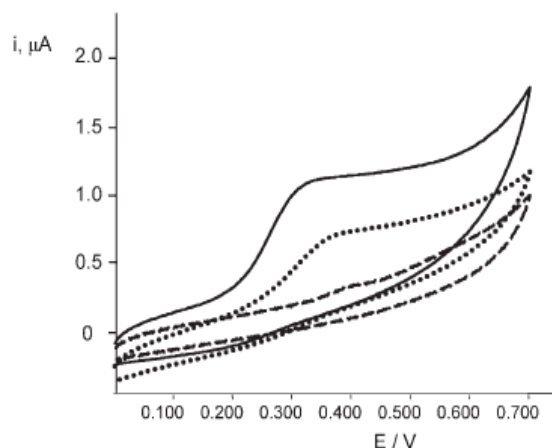


Fig. 2. Cyclic voltammograms of  $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$  1-naphtol at (—) Au<sub>colloid</sub>-graphite-Teflon and (·····) graphite-Teflon electrodes; (---) background voltammogram at the Au<sub>colloid</sub>-graphite-Teflon electrode. Supporting electrolyte,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  diethanolamine-HCl buffer solution of pH 10.0.

graphite-Teflon electrode. As can be observed, 1-naphtol exhibited an oxidation peak with  $E_p = +0.312 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl at the gold nanoparticles-modified electrode, whereas,

at the unmodified electrode, the peak current was approximately the half and appeared at  $E_p = +0.370 \text{ V}$ . These results suggested the existence of an electrocatalytic effect promoted by gold nanoparticles towards the oxidation of 1-naphtol. From the results shown in Figures 1 and 2, a potential value of  $+0.3 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl was selected to monitor amperometrically the antibody-antigen interaction. This potential value agrees with that recommended by Pemberton et al. for the electrochemical biosensing of progesterone using SPCE in order to avoid signal interferences from electroactive species present in milk [17]. These authors stated that is preferable to work at operating potentials below 400 mV.

The influence of 1-naphtyl phosphate substrate concentration on the current response was checked over the  $5 \times 10^{-5} - 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  range. An increase in the current occurred when the substrate concentration also increased, showing a region of saturation from  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . A 5 mM 1-naphtyl phosphate concentration, which was placed in the region of constant current of the curve, was selected in order to assure that the enzyme reaction rate only depends on the enzyme concentration [20].

### 3.1. Optimization of the Experimental Variables Involved on the Immunosensor Preparation

Graphite-Teflon composite pellets containing a 70% Teflon were employed as electrode matrices due to their appropriate mechanic and conducting characteristics [21]. The amount of colloidal gold incorporated into these pellets was optimized. The amperometric signal for 1 mM 1-naphtol increased with the colloidal gold loading up to 900  $\mu\text{L}$  of the colloidal gold dispersion (see Experimental), as it is displayed in Figure 3, as a consequence of the improved electron transfer kinetics in the presence of gold nanoparticles. From such a volume value, a level off and even a slight decrease of the signals were observed due to the increase in the resistance and double layer capacitance of the modified electrode, produced by the lower ratio of carbon sensing sites in the electrode material [13], similarly to that reported for a colloidal gold-modified carbon paste electrode [22].

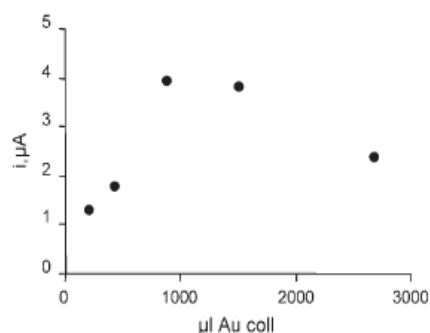


Fig. 3. Effect of the colloidal gold loading on the amperometric response of 1 mM 1-naphthol at  $\text{Au}_{\text{coll}}$ -graphite-Teflon electrodes.  $E_{\text{app}} = +0.30$  V.

On the other hand, the amount of antibody adsorbed onto the electrode surface plays an important role in the linear range and sensitivity of the immunosensor. The effect of the anti-Prog amount on the immunosensor response was evaluated by immobilizing each time 5  $\mu\text{L}$  of anti-Prog solutions prepared in the 0.33 to 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration range, using 5 mM 1-naphthyl phosphate as the enzyme substrate, and various progesterone concentrations in the range of 5 to 35  $\text{ng mL}^{-1}$ . Each experiment was carried out by depositing 8  $\mu\text{L}$  of a 5:3 Prog-AP: Prog mixture (see below) on the electrode surface. As can be observed in Figure 4, the current firstly increased with the concentration of anti-Prog, indicating the lower antibody loadings were not enough to bind the antigen and the AP-labeled antigen. However, from 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  anti-Prog, the current decreased suggesting blocking of the electrode surface by the biomolecule. The current tended to level off at a concentration which probably corresponds to the saturation of the gold nanoparticle adsorbing sites [9]. So, a concentration of 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  anti-Prog was selected in order to achieve the best sensitivity. Once the antibody was immobilized, BSA was employed to minimize nonspecific adsorption. The time of immersion of the bioelectrode in BSA solution, 5 min, was also optimized in order to attain the best reproducibility.

It should be noted that, as expected, similar experiments carried out with a graphite-Teflon electrode without gold nanoparticles, provide continuously decreasing amperometric responses due to the inappropriate immobilization of the antibody onto the electrode surface.

### 3.2. Optimization of Immunosensing Conditions

The influence of pH on the amperometric oxidation response of 1-naphthol generated through the enzyme reaction was tested in the 6.0 to 11.0 range. As expected, the highest currents were obtained at pH values ranged between 9 and 10, which coincides with those reported for the optimum alkaline phosphatase activity [23].

In order to perform the competitive assay, a low volume of progesterone (Prog) mixed with progesterone-alkaline

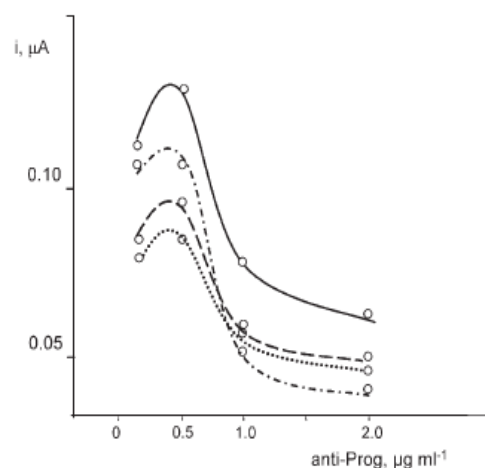


Fig. 4. Effect of the amount of immobilized anti-Prog on the determination of (—) 5  $\text{ng mL}^{-1}$ ; (---) 10  $\text{ng mL}^{-1}$ ; (---) 30  $\text{ng mL}^{-1}$ ; (- · - · -) 35  $\text{ng mL}^{-1}$  progesterone; 5  $\mu\text{L}$  anti-Prog solution; 5 mM 1-naphthyl phosphate; 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  diethanolamine-HCl buffer solution of pH 10.0.  $E_{\text{app}} = +0.30$  V.

phosphatase conjugate (Prog-AP) was deposited each time onto the immunoelectrode surface. Both the volume of this mixed solution and the Prog-AP/Prog ratio were optimized. The electrochemical response of the immunosensor increased with the volume of the mixture as a consequence of a higher labeled antigen loading for a constant amount of immobilized antibody. Nevertheless, volumes higher than 8  $\mu\text{L}$ , did not produce a further increase in the amperometric current. Using a volume of 8  $\mu\text{L}$ , the highest amperometric signal for the detection of progesterone was obtained for a 5:3 Prog-AP/Prog ratio, which coincides with that used for screen-printed biosensors for progesterone [15].

### 3.3. Determination of Progesterone

Figure 5 shows some amperometric responses of the anti-Prog- $\text{Au}_{\text{coll}}$ -graphite-Teflon immunosensor to progesterone standard solutions prepared with Prog concentrations ranging between 0 and 50  $\text{ng mL}^{-1}$ . As can be observed, the steady state current decreased as progesterone concentration increased, this decrease being related with the analyte concentration. Moreover, the amperometric responses were obtained remarkably fast, the steady state current being reached in 30–40 s from the addition of 1-naphthyl phosphate. The corresponding calibration plot for progesterone is displayed in Figure 6. Each depicted point corresponds to the mean value of three amperometric measurements of progesterone. Similarly to that observed for other immunosensors, a curvature in the calibration graph occurred for the higher progesterone concentration, because of the smaller current decreases measured for such concentration levels. A linear range (0.991) for progesterone was obtained in the 0–30  $\text{ng mL}^{-1}$  concentration range.

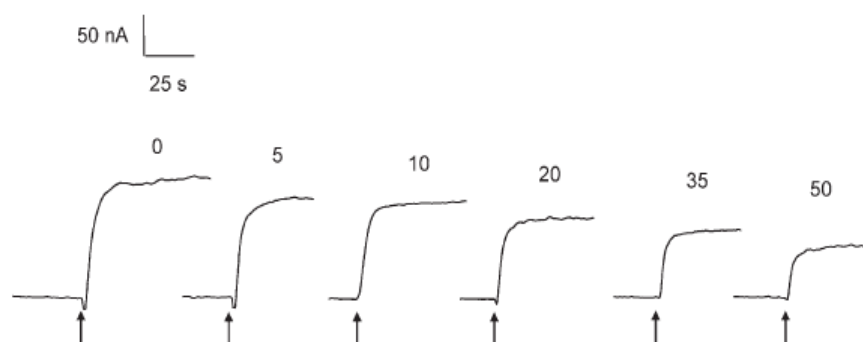


Fig. 5. Amperometric responses at the anti-Prog-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon immunosensor for different progesterone concentrations. Arrows denote the addition of 1-naphtyl phosphate. Other conditions as in Figure 4.

This linear range is appropriate for the analysis of Prog in real milk samples, where the analyte is about 5 ng mL<sup>-1</sup>. Furthermore, it should be remarked that the good linearity obtained for low Prog concentrations using this immunosensor design, improves the results reported for SPCE progesterone biosensors coated with IgG [18], where a hook effect, that is, a curvature of the calibration graph at the lowest antigen concentrations, was observed. The slope of the linear portion of the calibration graph displayed in Figure 6 is  $-1.2 \text{ nA ng}^{-1}\text{mL}$ , which is approximately 8-fold higher than that reported for the SPCE progesterone biosensors. The limit of detection calculated according to the  $\Delta S/N=3$  criterion was 0.84 ng mL<sup>-1</sup>.

The repeatability of the immunosensor was checked for a Prog concentration of 20 ng mL<sup>-1</sup>, and measuring repeatedly the signal ( $n=10$ ) after the addition of 1-naphtyl phosphate. The *RSD* value obtained, 3.5%, demonstrated a good repeatability of the amperometric measurements using the same immunosensor. Interassay reproducibility

was evaluated by measuring the above mentioned Prog concentration with immunosensors prepared in three different days. A *RSD* value of 8.2% shows an acceptable fabrication reproducibility of the sensors.

### 3.4. Determination of Progesterone in Milk

The developed anti-Prog-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon bioelectrode was applied to the determination of progesterone in milk samples, which were spiked with the analyte at a 3.5 ng mL<sup>-1</sup> concentration level. The analytical procedure was extremely simple involving only the dilution of 285  $\mu\text{L}$  of spiked milk up to a final volume of 1000  $\mu\text{L}$ . A 3- $\mu\text{L}$  aliquot of this diluted sample solution was added to 5  $\mu\text{L}$  of the Prog-AP solution, and the whole solution was deposited on the electrode surface. Following the experimental procedure described in Section 2.3.3, amperometry at 0.30 V was then applied. A calibration graph for progesterone following this procedure was needed to be constructed as a consequence of the remarkable matrix effect observed, probably due to some blocking effect from the proteins, fats and other components of milk samples [17]. This calibration graph exhibited a linear range ( $r=0.993$ ) over the 0–15 ng mL<sup>-1</sup> concentration range, with a slope value of  $-0.9 \text{ nA ng}^{-1}\text{mL}$ . Using this calibration graph, the analysis of seven milk samples yielded a mean progesterone concentration of  $3.5 \pm 0.2 \text{ ng mL}^{-1}$ , which signifies a mean recovery of  $101 \pm 6\%$ , thus demonstrating fairly well the usefulness of the immunosensor for the determination of progesterone at the concentration levels required in this type of analysis.

## 4. Conclusions

The novel amperometric immunosensor for the determination of progesterone, based on the immobilization of anti-Prog on gold nanoparticles onto the surface of a colloidal gold graphite-Teflon composite electrode, offers remarkable analytical advantages with respect to previous progesterone immunosensors designs. So, both the range of linearity and the sensitivity obtained for progesterone are

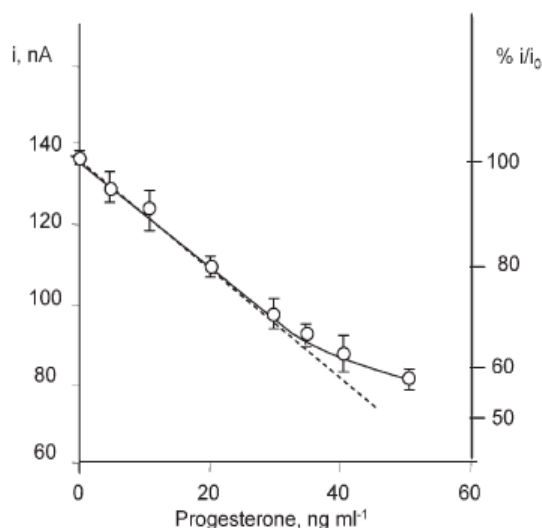


Fig. 6. Calibration plot for progesterone obtained with the anti-Prog-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon immunosensor.  $E_{\text{app}} = +0.30 \text{ V}$ .

considerably improved with respect to screen printed carbon electrode progesterone immunosensors, which can be attributable to the combination of the use of gold nanoparticles and graphite-Teflon composite electrodes. Furthermore, a good repeatability of the measurements and an acceptable reproducibility of the immunosensor fabrication were obtained. The biosensor analytical performance would permit the detection of changes in the progesterone concentration at the physiological level related with fertility tests.

### 5. Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia (Project BQU 2003–00365) and PR27/05–13860-BSCH is gratefully acknowledged

### 6. References

- [1] C. A. Vijayavardhara, H. B. Halsall, W. R. Heineman, in *Electroanalytical Methods for Biological Materials* (Eds: A. Brajter-Toth, J. Q. Chambers), Marcel Dekker, New York **2002**, p. 329.
- [2] D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1225.
- [3] J. Zhao, R. W. Henkens, J. Stonehuerner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *327*, 109.
- [4] A. N. Shipway, M. Lahav, I. Wilner, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 993.
- [5] X. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, M. R. Smyth, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 327.
- [6] Y. Zhuo, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhang, X. Li, N. Wang, Q. Zhu, *Sens. Actuators B* **2006**, *114*, 631.
- [7] X. Li, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, Y. Zhuo, Y. Zhang, *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 356.
- [8] L. Wu, J. Chen, D. Du, H. Ju, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 1208.
- [9] R. Liang, J. Qiu, P. Cai, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 223.
- [10] Y. Y. Xu, C. Bian, S. Chen, S. Xia, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *561*, 48.
- [11] J. Chen, F. Yan, F. Tan, H. Ju, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1696.
- [12] Y. Liu, H. Jiang, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1007.
- [13] V. Carralero, M. L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 730.
- [14] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 158.
- [15] P. Hart, R. M. Pemberton, R. Luxton, R. Wedge, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1113.
- [16] R. M. Pemberton, J. P. Hart, J. A. Foulkes, *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3567.
- [17] R. M. Pemberton, J. P. Hart, T. T. Mottram, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 715.
- [18] Y. F. Xu, M. Velasco-García, T. T. Mottram, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2061.
- [19] M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 20.
- [20] C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 403.
- [21] B. Serra, S. Jiménez, M. L. Mena, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 217.
- [22] S. Liu, S. Liu, J. Yu, H. Ju, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *540*, 61.
- [23] S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *424*, 57.

---

Nanostructured progesterone immunosensor using  
a tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon  
biosensor as amperometric transducer

---

V. Carralero, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón

*Analytica Chimica Acta*

---

596, 86-91 (2007)



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Analytica Chimica Acta 596 (2007) 86–91

ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA[www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

## Nanostructured progesterone immunosensor using a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensor as amperometric transducer

Verónica Carralero, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño\*, José M. Pingarrón

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain*

Received 19 March 2007; received in revised form 23 May 2007; accepted 24 May 2007

Available online 3 June 2007

### Abstract

A novel progesterone immunosensor using a colloidal gold–graphite–Teflon–tyrosinase composite biosensor as amperometric transducer is reported. A sequential competitive configuration between the analyte and progesterone labelled with alkaline phosphatase (AP) was used. Phenyl phosphate was employed as the AP-substrate and the enzyme reaction product, phenol, was oxidized by tyrosinase to *o*-quinone, which is subsequently reduced at  $-0.1$  V at the biocomposite electrode. Variables such as the concentration of phenyl phosphate, the amount of antibody attached to the electrode surface, immersion time in a 2% BSA solution, working pH and incubation times in progesterone and AP conjugate were optimized. A linear calibration graph for progesterone was obtained between 0 and  $40 \text{ ng mL}^{-1}$  with a slope value of  $-82.3 \text{ nA ng}^{-1} \text{ mL}$ , and a detection limit of  $0.43 \text{ ng mL}^{-1}$ . The time needed to reach the steady-state current from the addition of phenyl phosphate was 30–40 s. These analytical characteristics improve substantially those reported for other progesterone immunosensors. A lifetime of 14 days with no need to apply any regeneration procedure was also achieved. The usefulness of the immunosensor was evaluated by determining progesterone in milk samples spiked with the analyte at 5.0 and  $1.5 \text{ ng mL}^{-1}$  concentration levels. Following a very simple procedure, involving only sample dilution, mean recoveries ( $n = 7$ ) of  $98 \pm 3\%$  and  $99 \pm 3\%$ , respectively, were obtained.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Electrochemical immunosensor; Progesterone; Colloidal gold; Tyrosinase biosensor

### 1. Introduction

The use of electrochemical immunosensors as efficient analytical tools in fields such as clinical diagnosis and environmental monitoring is nowadays well established [1,2]. This kind of immunosensors gathers excellent analytical capabilities as sensitivity, reproducibility, simplicity of construction and use, and feasible miniaturization. These important advantages become more evident insofar as the immobilization of immunoreagents and the transduction event are more efficient. Thus, the preparation of bioelectrodes combining immobilization methods capable of improving stability with no significant loss of the biological activity of biomolecules, with electrochemical transducers that enhance electron transfer, constitutes a challenge in modern bioanalytical chemistry. Related to this goal, electrochemical biosensors involving the use of gold

nanoparticles have demonstrated to possess interesting features [3]. The ability of gold nanoparticles to adsorb biological molecules with no loss of activity as well as to promote electron transfer between redox proteins and electrodes, is an extremely useful characteristic for the preparation of reliable biosensors [4,5]. In particular, some examples of electrochemical immunosensors using gold nanoparticles have been reported recently in the literature. Modified glassy carbon electrodes supporting gold nanoparticles were used to prepare amperometric immunosensors for determination of paraoxon [6] and carcinoembryonic antigen [7]. A flow-injection immuno-bioassay for interleukin-6 in humans using gold nanoparticles-modified screen-printed graphite electrodes has been also reported [8]. Immunosensors for hepatitis B prepared from hybrid materials using sol–gel fabrication and gold nanoparticles have been also described [9,10]. A carbon paste electrode modified with gold nanoparticles and thionine has been used for the design of an immunosensor for carcinoma antigen 125 [11]. Very recently, we have reported on an amperometric immunosensor for the determination of progesterone using a colloidal gold–graphite–Teflon

\* Corresponding author. Tel.: +34 1 3944315; fax: +34 1 3944329.

E-mail address: [yseo@quim.ucm.es](mailto:yseo@quim.ucm.es) (P. Yáñez-Sedeño).

composite electrode [12]. The immunosensor functioning was based on a competitive assay involving progesterone labelled with alkaline phosphatase [13–15]. Monitoring of the affinity reaction was carried out by the amperometric detection of the electrochemical oxidation of the alkaline phosphatase enzyme reaction product.

In this article, a novel progesterone immunosensor with improved analytical performance is reported. The determination of this hormone has a high interest in order to achieve a rapid control of pregnancy and fertility periods for artificial insemination of cows [16]. The proposed immunosensor design makes use of a colloidal gold–graphite–Teflon-tyrosinase biosensor as amperometric transducer. This biosensor combines the advantageous properties of composite graphite–Teflon electrode matrices for the immobilization of enzymes [17], and of gold nanoparticles incorporated into such a matrix by simple physical inclusion, to achieve a high analytical performance for the detection of different phenolic compounds [18]. These advantages are profited to enhance the electrochemical transduction event of the affinity reaction. Furthermore, the immunosensor design allows the direct attachment of the antibodies involved in the immunological reaction on the composite tyrosinase bioelectrode surface, which improves the simplicity of the design as well as the renewability of the biosensing surface.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

Monoclonal anti-progesterone (anti-Prog) and tyrosinase (Tyr, from mushroom, EC 1.14.18.1, activity of 2590 units per mg of solid) were purchased from Sigma. Progesterone labelled with alkaline phosphatase (AP–prog), prepared by reacting 9 mg of AP with 0.5 mg progesterone glucuronide in a 2 mL final volume and diluted 1/40,000, was obtained from Ridgeway Science Ltd. (Alvington, Gloucestershire, UK). Unlabelled progesterone (Aldrich, 98%) and phenyl phosphate disodium salt dihydrate (Sigma, 98%) were also used. Bovine serum albumin (BSA) (97%), phenol (99%) and magnesium chloride (99%) were all from Merck. TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Sigma, 99%) was also used. A stock 1 mM solution of progesterone was prepared in methanol and stored at 4 °C. More diluted progesterone and 0.01 M phenol solutions were prepared daily by dilution with 0.1 M TRIS (pH 7.0) buffer solution.

Colloidal gold was prepared as reported before [19]. Briefly, 2.5 mL of 1% sodium citrate solution was added to 100 mL of a boiling aqueous solution containing 1 mL 1% (w/w) HAuCl<sub>4</sub> (Sigma, >49% as Au). The diameter of gold nanoparticles, measured by electron scanning microscopy, was 16 ± 2 nm. Graphite powder (Ultra Carbon, Bay City, MI, USA) and Teflon powder (Aldrich) were also used for the construction of the composite electrode.

### 2.2. Apparatus and electrodes

Electrochemical measurements were performed using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab, with the general-purpose

electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.) electrochemical software. A three-electrode cell (a BAS VC-2 10-mL glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode, a BAS MF-2063 Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode, and the immunosensor as the working electrode, was used. All experiments were performed at room temperature.

### 2.3. Preparation of the Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon biosensor

Tyrosinase-colloidal gold–graphite–Teflon bioelectrodes were constructed as described previously [18]. Briefly, 150 mg graphite and 900 µL of the colloidal gold suspension prepared as described above were thoroughly mixed by mechanic stirring for 2 h. Then, water was evaporated under air current at room temperature. Next, 34.75 mg tyrosinase and 400 µL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution of pH 7.4 were incorporated to the mixture by stirring for 2 h in an ice bath. The resulting mixture was dried and 415.25 mg of Teflon powder was added and thoroughly mixed by hand. Then, the mixture was pressed into pellets, by means of a Carver pellet press (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) at 10,000 kg cm<sup>-2</sup> for 10 min. These pellets were 1.3 cm in diameter and approximately 0.4 cm thick. From this main pellet, several (five or six) 3.0 mm diameter cylindrical portions of each pellet were bored, each portion constituting a different composite electrode. Each electrode was press-fitted into a Teflon holder, and the electrical contact was made through a stainless steel screw.

### 2.4. Immunosensor preparation

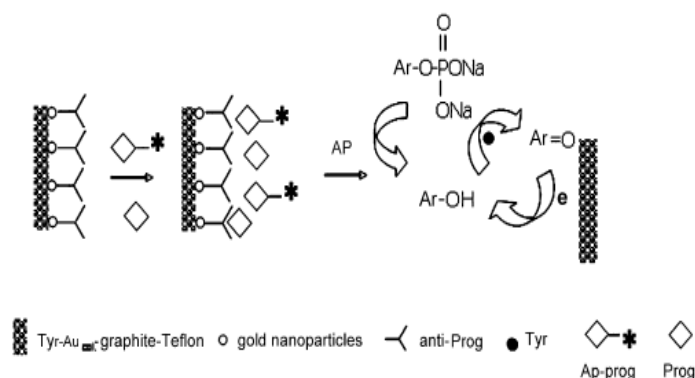
A 5.2-µL aliquot of a 0.01 mg mL<sup>-1</sup> anti-Prog solution was deposited on the surface of the tyrosinase composite biosensor and allowed to dry in air under room temperature. Then, the bioelectrode was immersed for 10 min in a 2% (w/w) BSA solution and washed carefully with 0.1 M TRIS buffer solution of pH 7.0. The resulting anti-Prog–(Tyr–Au<sub>coll</sub>–graphite–Teflon) immunosensor was immersed in 10 mL of the analyte progesterone solution for 30 min. Then, the immunosensor was incubated in 10 mL of the AP–prog solution during 40 min.

### 2.5. Electrochemical detection of progesterone

The electrochemical detection of progesterone was carried out by immersion of the immunosensor in the electrochemical cell containing 10 mL of a 0.1 mol L<sup>-1</sup> TRIS buffer of pH 7.0 and 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Then, 20 µL of 0.01 mol L<sup>-1</sup> phenyl phosphate was added and the amperometric measurement of the reduction current from *o*-quinone was carried out at –0.1 V versus Ag/AgCl.

## 3. Results and discussion

The immunosensor functioning is shown in Scheme 1. It is based on a sequential competitive assay between the analyte Prog and the antigen labelled with alkaline phosphatase (AP–prog) for the binding sites of the anti-Prog immobilized



Scheme 1. Schematic diagram of the progesterone immunosensor based on electrochemical detection at a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode using sequential competitive assay: AP, alkaline phosphatase; Prog, progesterone; ArOH, phenol.

antibody. Considering the ability of gold nanoparticles to adsorb proteins with no loss of biological activity, it is assumed that antibodies were preferentially linked to gold nanoparticles at the electrode surface. Phenyl phosphate was employed as the AP-substrate in order to generate phenol, which is catalytically oxidized by Tyr to the *o*-quinone and this quinone is electrochemically reduced at  $-0.1$  V at the tyrosinase–colloidal gold composite electrode. The use of this biosensor as amperometric transducer permits the obtention of sensitive responses for phenol at a potential such as  $-0.10$  V. The presence of gold nanoparticles in the electrode matrix gives rise to enhanced kinetics of both the enzyme reaction with Tyr and the electrochemical reduction of the *o*-quinone at the electrode surface, thus allowing the achievement of a high sensitivity for the detection of phenol. In fact, a limit of detection of 20 nM was obtained using this biosensor design [18].

As expected, the concentration of phenyl phosphate used as AP-substrate affected the amperometric response obtained. It was tested over the  $10$ – $200$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  range. The current increased with the substrate concentration with a region of saturation from  $50$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Although the use of a substrate concentration in the zone of saturation is desirable in order to ensure that the enzyme reaction rate depends only on the enzyme concentration [20], in this case, high concentrations of phenyl phosphate produced significant background currents attributed to traces of free phenol in the reagent employed [14]. Therefore, the concentration of phenyl phosphate was selected by considering the ratio between the amperometric response obtained with the immunosensor and the current observed from phenyl phosphate solutions at the tyrosinase–colloidal gold composite electrode. The best signal-to-background current ratio was found for  $20$   $\mu\text{M}$  phenyl phosphate and, accordingly, this concentration was chosen for further work. Moreover, this concentration value ensures a sufficient AP-substrate excess for an adequate monitoring of the affinity reaction.

### 3.1. Optimization of the variables involved in the immunosensor performance

Since the composition of the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode was optimized previously [18], only the amount of

anti-Prog attached to the electrode surface was checked with respect to the immunosensor construction. This was accomplished by depositing on the surface (see Section 2)  $5$   $\mu\text{L}$  of  $0.1$ – $0.01$   $\text{mg mL}^{-1}$  anti-Prog solutions so that the antibody loading adsorbed ranged between  $0$  and  $520$  ng. The resulting immunosensors were tested against a  $10$   $\text{ng mL}^{-1}$  progesterone solution with  $40$  min incubation in  $10$  mL of the AP–prog stock solution. Fig. 1 shows a fast increase in the measured current with the antibody loading for low amounts of anti-Prog. However, from  $52$  ng anti-Prog (which corresponded to  $5.2$   $\mu\text{L}$  of a  $0.01$   $\text{mg mL}^{-1}$  anti-Prog stock solution), the current decreased slightly which suggested that high antibody concentrations produced a decrease in the immunosensor response which can be related with the inactivation of antibody binding sites by steric hindrance. The antibody concentration at which the current reached the highest value probably is related with saturation of the gold nanoparticles adsorbing sites at the electrode surface [21]. Therefore, the above mentioned anti-Prog loading was selected for further work.

After antibody immobilization, the bioelectrode was immersed in a 2% BSA solution to minimize nonspecific adsorption. The time of immersion was also optimized. Practically constant currents were obtained for incubation times between  $5$  and  $15$  min, a noticeable current decrease being observed for

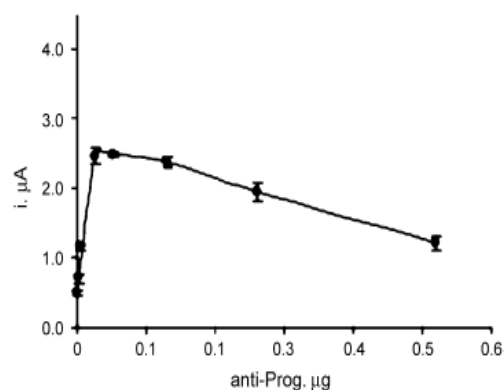


Fig. 1. Effect of the anti-Prog amount immobilized onto a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode on  $10$   $\text{ng mL}^{-1}$  progesterone;  $20$   $\mu\text{M}$  phenyl phosphate;  $0.1$  M TRIS buffer solution of pH 7.0;  $E_{\text{app}} = -0.10$  V;  $n = 5$ .

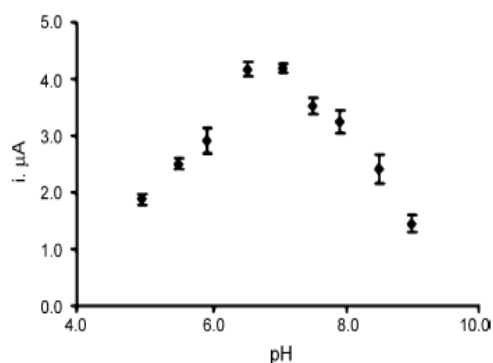


Fig. 2. Effect of pH on the amperometric response measured at a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode incubated in the AP-prog solution;  $n = 5$ .

longer incubation times. Therefore, an immersion time of 10 min was used for subsequent studies.

The immunosensor functioning implies the coupling of two enzyme reactions, the one involving AP to generate phenol, and the catalytic oxidation of phenol by tyrosinase. However, the optimum working pH for these enzyme reactions is not the same. It is well known that basic media are the most appropriate for AP reaction, while neutral pH is optimum for tyrosinase biosensors [20,18]. Fig. 2 shows the effect of pH on the amperometric current measured with a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode, which was incubated in the AP-prog solution, after adding  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  phenyl phosphate. As can be observed, the highest response was obtained around pH 7, thus suggesting that the enzyme reaction with tyrosinase is more limiting for the obtention of an appropriate current monitoring than that of the AP-substrate hydrolysis.

Incubation times of the immunosensor in progesterone solution and in the AP conjugate (AP-prog) solution were also optimized. Fig. 3 shows the results obtained. Firstly, the effect of the incubation time in the AP-prog solution was checked after immersion of the immunosensor in a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  progesterone solution for 30 min. As can be seen, the current increased as the incubation time was longer with a level-off after approximately 40 min, this period of time being chosen for further work. Then, the effect of the incubation time in a

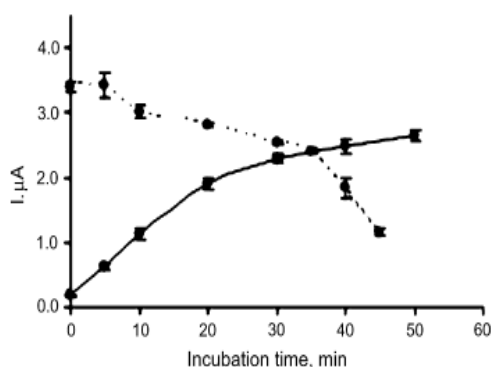


Fig. 3. Effect of the incubation time in: (—) the AP-prog solution after immersion of the immunosensor in a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  Prog solution for 30 min; (---) a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  progesterone before incubation for 40 min in the AP-prog solution. Other conditions as described in Fig. 1;  $n = 5$ .

$10 \text{ ng mL}^{-1}$  progesterone solution was tested, before incubation for 40 min in the AP-prog solution. The current measured showed a slight decrease with incubation time up to approximately 35 min, and a sharper decrease for longer times. This behavior is consistent with the competitive configuration used, since as the incubation with progesterone was longer, the possibility of AP-prog molecules to compete efficiently for the antibody binding sites was lower and, consequently, smaller amperometric signals were obtained. Furthermore, the amperometric response in the absence of progesterone (blank response) did not change significantly with the incubation time. Accordingly, 30 min was selected as the incubation time in the antigen solution.

The response obtained with the immunosensor under these optimized conditions was compared with that found using a Tyr-graphite-Teflon electrode (i.e. without gold nanoparticles), which was incubated in the immunoreagents solutions exactly under the same conditions. Repetitive amperometric measurements showed a continuous decrease of the amperometric response, with a 25% lower steady-state current for the seventh measurement, which remained more or less constant for further measurements. However, as commented below, no decrease in the amperometric response was observed when working with the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode. This behavior can be explained as a consequence of the more stable immobilization of the antibody onto the electrode surface prepared with gold nanoparticles, due to their ability to adsorb proteins retaining the biological activity. Furthermore, the amperometric response obtained at the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor was 58% higher than that found at the biosensor with no colloidal gold, demonstrating the enhanced kinetics of the reactions in the presence of gold nanoparticles.

### 3.2. Analytical characteristics of the electrochemical immunosensor

Once the variables involved both in the immunosensor preparation and in the immunosensing event were optimized, a calibration curve for progesterone was constructed. This calibration graph shows a decrease in the steady-state amperometric current when increasing progesterone concentration, which corresponds to a sequential competitive immunosensing approach (Fig. 4). The range of linearity ( $r^2 = 0.991$ ) ranged between 0 and  $40 \text{ ng mL}^{-1}$  with a slope value of  $-82.3 \text{ nA ng}^{-1} \text{ mL}$ . Furthermore, the time needed to reach the steady-state current from the addition of phenyl phosphate was approximately 30–40 s.

Several important analytical advantages can be deduced when the immunosensor performance is compared with that of the few other progesterone immunosensors reported in the literature. Firstly, the response shows a good linearity for low progesterone concentrations (it should be noted that usual progesterone concentration in cow's milk is around  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Conversely, some of the progesterone immunosensors described previously [13,15] exhibited a hook effect, i.e. a curvature of the calibration graph, for low antigen concentrations. Although this hook

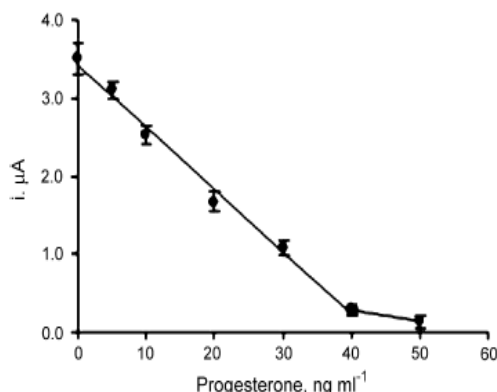


Fig. 4. Calibration plot for progesterone obtained with the anti-Prog-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor. Other conditions as described in Fig. 1;  $n=5$ .

effect was not observed for the calibration graph constructed with the immunosensor using a colloidal gold-graphite-Teflon composite electrode [12], the monitoring of the affinity reaction was accomplished in this case at +0.30 V. On the contrary, the use of a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor as transducer allows a detection potential such as -0.1 V to be applied, thus minimizing the impact of potential interferences from electrochemically active compounds that may be present in real samples.

Concerning sensitivity, the slope value of the progesterone calibration plot is almost 100-fold higher than that obtained with the immunosensor design using the colloidal gold-graphite-Teflon electrode [12], and more than 3-fold higher than that achieved with screen-printed amperometric biosensors in which the antibody was immobilized by interaction with a layer of IgG coated previously onto the screen-printed carbon electrode [16]. The limit of detection calculated for progesterone with the anti-Prog-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor was of 0.37 ng mL<sup>-1</sup>, according to the progesterone concentration which was three-times the noise mean value ( $n=10$ ). If the concentration corresponding to the  $y$  value obtained by subtracting  $3 \times$  S.D. of zero point (no analyte) from the mean of the zero standards measurements ( $n=10$ ), is used to calculate the limit of detection, a value of 0.43 ng mL<sup>-1</sup> is obtained. These values are approximately one order of magnitude lower than that reported with an immunoassay using the BIACORE<sup>TM</sup> surface plasmon resonance (SPR) biosensor [21]. In summary, the analytical characteristics of the immunosensor constructed using the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode demonstrate an improved performance with respect to other immunosensors for the determination of low concentrations of progesterone.

The inherent advantage of stability that the biosensors based on the use of composite electrodes modified with gold nanoparticles possess [18] leads also to an improved operational stability of the progesterone immunosensor. Different aspects concerning stability were evaluated. Firstly, repetitive amperometric measurements ( $n=10$ ) for a progesterone concentration of 10 ng mL<sup>-1</sup> were carried out after the addition of phenyl phosphate. The relative standard deviation (R.S.D.) value calculated

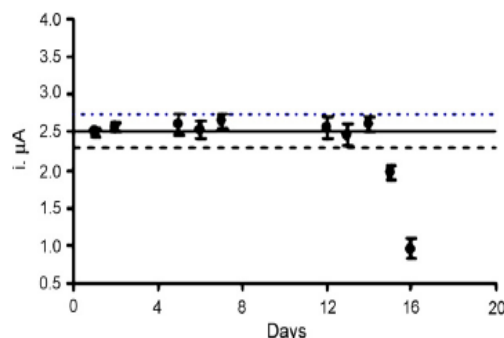


Fig. 5. Control chart constructed for one anti-Prog-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor. Data show the mean values of three measurements from 10 ng mL<sup>-1</sup> progesterone solutions.  $E_{app} = -0.10$  V;  $n=5$ .

for the steady-state current, 2.6%, showed a good repeatability of the amperometric responses with the same immunosensor. Furthermore, the amperometric responses obtained with nine different immunosensors, prepared in three different days, for the same progesterone concentration level (10 ng mL<sup>-1</sup>) gave a R.S.D. value of 2.8%, which demonstrated the excellent reproducibility achieved in the construction of the nanostructured immunosensors.

Finally, the lifetime of the anti-Prog-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor was evaluated by performing daily three measurements of 10 ng mL<sup>-1</sup> progesterone. After use, the immunosensor was stored under dry conditions at 4 °C. The control chart constructed (Fig. 5) shows that the mean initial response remained inside the control limits ( $\pm 3 \times$  the standard deviation of the measurements performed in the first day) for 14 days with no need to apply any regeneration procedure to the immunosensor surface as well as any further incubation step. This very good immunosensor stability can be attributed to the demonstrated capability of gold nanoparticles to adsorb proteins retaining their biological activity. Furthermore, after the useful lifetime mentioned, the preparation of a new immunosensor was extremely simple, involving only polishing for 5 s on a 150 grit SiC paper of the rigid composite bioelectrode to obtain a fresh Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon surface [18], onto which the antibody can be deposited again.

### 3.3. Analysis of progesterone in spiked milk samples

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was evaluated by determining progesterone in milk samples which were spiked with the analyte at two different concentration levels, 5.0 and 1.5 ng mL<sup>-1</sup>. It should be noted that the onset of oestrus in dairy cattle is indicated by a concentration of milk progesterone below 2–5 ng mL<sup>-1</sup> [14]. The analytical procedure involved was extremely simple, with no sample treatment. After immobilization of the antibody onto the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor, and following the procedure described in Section 2, the immunosensor was immersed in the milk sample for 30 min and then incubated in the AP-prog solution during 40 min. Amperometry at -0.10 V was used to

monitor the affinity reaction. The unspiked samples did not contain detectable amount of progesterone as it was verified by performing successive 2- and 3-fold dilutions of the sample. No significant difference in the amperometric current was observed with respect to the undiluted sample, thus indicating the absence of endogenous progesterone in the analysed milk. A noticeable matrix effect was observed when the slope value of the calibration plot for progesterone constructed with milk samples spiked with the analyte in the 0–20 ng mL<sup>-1</sup> concentration range ( $r=0.997$ ),  $-41 \text{ nA ng}^{-1} \text{ mL}$ , was compared with the slope value mentioned above for the calibration graph constructed with progesterone standard solutions. Therefore, the calibration graph obtained with spiked milk which did not contain detectable endogenous progesterone was employed for progesterone quantification. According to the zero mean value minus  $3 \times \text{S.D.}$  of zero point criterion, a limit of detection of  $0.48 \text{ ng mL}^{-1}$  was calculated relative to this calibration graph in milk. The analysis of fourteen different milk samples, seven of them spiked at the  $5.0 \text{ ng mL}^{-1}$  concentration level, and the other seven samples spiked at the  $1.5 \text{ ng mL}^{-1}$  level, yielded progesterone mean concentrations of  $4.9 \pm 0.2 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $1.49 \pm 0.05 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectively. These concentrations imply mean recoveries of  $98 \pm 3\%$  and  $99 \pm 3\%$ , respectively. These results show fairly well the usefulness of the developed immunosensor for the determination of low progesterone concentrations in milk.

#### 4. Conclusion

The synergic combination of the advantages provided by nanostructured biosensors with gold nanoparticles and the use of a composite bioelectrode matrix, into which the nanoparticles are incorporated by simple physical inclusion, permits the development of robust immunosensors in which the antibody is directly attached to the electrode surface. Furthermore, the detection approach of the affinity reaction involving a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon electrode implies a significant improvement of the analytical characteristics achieved for the determination of progesterone with respect to previous immunosensor designs, and permits the immunosensor application for the analysis of real samples.

#### Acknowledgment

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia (Projects CTQ2006-02905 and CTQ2006-02743) and PR27/05-13860-BSCH is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] C.A. Vijayavardhara, B. Halsall, W. Heineman, in: A. Brajer-Toth, J.Q. Chambers (Eds.), *Electroanalytical Methods for Biological Materials*, Marcel Dekker, New York, 2002, p. 329.
- [2] D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García, *Electroanalysis* 14 (2002) 1225.
- [3] P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 884.
- [4] J. Zhao, R.W. Henkens, J. Stonehuemer, J.P. O'Daly, A.L. Crumbliss, *J. Electroanal. Chem.* 327 (1992) 109.
- [5] Y. Xiao, H.X. Ju, H.Y. Chen, *Anal. Biochem.* 278 (2000) 22.
- [6] S.Q. Hu, J.W. Xie, Q.H. Xu, K.T. Rong, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Talanta* 61 (2003) 769.
- [7] X. Li, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, Y. Zhuo, Y. Zhang, *J. Biotechnol.* 123 (2006) 356.
- [8] K.Z. Liang, W.J. Mu, *Anal. Chim. Acta* 580 (2006) 128.
- [9] R. Liang, J. Qiu, P. Cai, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 223.
- [10] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, X. Zhong, Y. Liu, J. Dai, *Clin. Biochem.* 39 (2006) 309.
- [11] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chim. Acta* 564 (2006) 158.
- [12] V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 19 (2007) 853.
- [13] R.M. Pemberton, J.P. Hart, P. Stoddard, J.A. Foulkes, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 495.
- [14] R.M. Pemberton, J.P. Hart, T.T. Mottram, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 715.
- [15] Y.F. Xu, M. Velasco-García, T.T. Mottram, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2061.
- [16] P. Hart, R.M. Pemberton, R. Luxton, R. Wedge, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1113.
- [17] B. Serra, S. Jiménez, M.L. Mena, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 217.
- [18] V. Carralero, M.L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 730.
- [19] M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Biochem.* 336 (2005) 20.
- [20] C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 403.
- [21] E.H. Gillis, J.P. Gosling, J.M. Sreeman, M. Kane, *J. Immun. Methods* 267 (2002) 131.

---

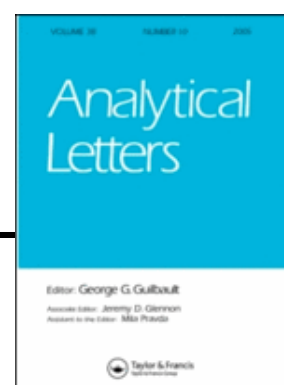
Amperometric IgG Immunosensor using  
Tyrosinase-colloidal gold-Graphite-Teflon  
biosensor as transducer

---

V. Carralero, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón

*Analytical Letters*

41, 244-259(2008)



*Analytical Letters*, 41: 244–259, 2008  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN 0003-2719 print/1532-236X online  
DOI: 10.1080/00032710701792646



## Amperometric IgG Immunosensor using a Tyrosinase-Colloidal Gold-Graphite-Teflon Biosensor as a Transducer

V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño,  
and J. M. Pingarrón

Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University  
Complutense of Madrid, Madrid, Spain

**Abstract:** An IgG immunosensor using a colloidal gold-Tyrosinase-graphite-Teflon composite biosensor as an amperometric transducer is reported. Protein A was used to immobilize the antibody on the biosensor surface and a sandwich-type configuration using alkaline phosphatase (AP) labeled anti-IgG was employed. Phenyl phosphate was used as the AP-substrate, and the enzyme reaction product, phenol, was catalytically oxidized by tyrosinase to the *o*-quinone, which is subsequently reduced at  $-0.1$  V at the biocomposite electrode. Variables such as the concentration of phenyl phosphate, the amount of antibody attached to the electrode surface, the immersion time into a 2% BSA solution and the incubation time into IgG, protein A and AP conjugate solutions, were optimized. Electrochemical impedance spectroscopy was used to monitor all the steps involved in the preparation of the immunosensor. A linear calibration graph for IgG was obtained between 5 and 100 ng ml<sup>-1</sup> IgG, with a slope value of 11.8 nA ng<sup>-1</sup> ml, and a detection limit of 2.6 ng ml<sup>-1</sup>. These analytical characteristics are competitive with other IgG electrochemical immunosensor designs. The developed anti-IgG (Tyr-Au<sub>col</sub>-graphite-Teflon) immunosensor was applied to IgG determination in a spiked serum sample with a recovery of 103 ± 6% for a 10 ng ml<sup>-1</sup> concentration level.

**Keywords:** Electrochemical immunosensor, gold nanoparticles, composite electrodes, immunoglobulin G

Received 6 September 2007; accepted 12 October 2007

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia (Projects CTQ2006-02905 and CTQ2006-02743), and PR27/05-13860-BSCH is gratefully acknowledged.

Address correspondence to J. M. Pingarrón, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain.  
E-mail: pingarro@quim.ucm.es

## INTRODUCTION

Electrochemical immunosensors combine excellent analytical capabilities such as sensitivity, reproducibility, simplicity of construction and use, low cost, speed of analysis, and feasible miniaturization, with the inherent selectivity of the antibody-antigen recognition processes. Different strategies have been used (Hernández-Santos et al. 2002; Vijayavardhara et al. 2002) to achieve efficient immobilization of the immunoreagents on the electrode surface. Among them, the use of gold nanoparticle-modified electrodes have demonstrated to be a useful tool for the preparation of immunosensors (Fu et al. 2005; Carralero et al. 2007). Conversely to direct adsorption of proteins onto metal electrode surfaces, which usually leads to denaturation, gold nanoparticles cannot only enhance the amount of antigen or antibody immobilized onto electrode surface but also preserve the activity of these immobilized biomolecules (Chen et al. 2006).

Various configurations of immunosensors using gold nanoparticles have been recently described in the literature. Amperometric immunosensors prepared with glassy carbon (Hu et al. 2003; Li et al. 2006) or screen-printed (Liang and Mu 2006) electrodes modified with gold nanoparticles have been used for the determination of paraoxon, carcinoembryonic antigen, and interleukin-6. An amperometric immunosensor constructed by a layer-by-layer assembly of gold nanoparticles/thionine/Nafion-modified gold electrode for the determination of  $\alpha$ -1-fetoprotein has been also described (Zhuo et al. 2006). Multilayer films of gold nanoparticles/tris(2,2'-bipyridyl)cobalt(III) onto a platinum electrode have been used for the construction of an immunosensor for hepatitis B antigen (Tang et al. 2005). Gold nanoparticles were also assembled into a three-dimensional sol-gel matrix for amperometric human chorionic gonadotrophin immunosensing (Chen et al. 2006). We have recently reported an amperometric immunosensor for progesterone based on the direct attachment of the antibodies onto the surface of a colloidal gold-graphite-Teflon composite electrode and using a competitive assay involving progesterone labeled with alkaline phosphatase (Carralero et al. 2007a). A more sensitive configuration based on the incorporation of tyrosinase to the composite electrode has been also developed (Carralero et al. 2007b).

As a typical model analyte, many different strategies for the preparation of electrochemical immunosensors for IgG have been described. The analytical characteristics of some recent developments are summarized in Table 1. Screen-printed electrodes (SPEs) have often been used for these applications (Darain et al. 2003; Diaz-González 2005; Messina et al. 2007). Metal-oxide matrices have been also used for developing of IgG immunosensors (Wilson and Rauh 2004; Wang et al. 2006). An amperometric immunoelectrode constructed by antibody loading in an iridium oxide matrix has also been reported (Wilson and Rauh 2004). Moreover, a sequential sandwich immunoassay based on a ZnO/chitosan composite-modified GCE was

Table 1. Electrochemical immunosensors for the determination of immunoglobulin G

Electrode	Immuno-sensor preparation	Technique	Assay mode	Analyte/sample	Linear range, ng ml <sup>-1</sup>	LOD, ng ml <sup>-1</sup>	Ref.
Anti-IgG-biotin-avidin-HRP-TCAP-SPCE	Covalent bonding of HRP and streptavidin on TCAP; immobilization of biotinylated anti-IgG	Amperom. E = -0.35 V	Competitive; IgG-GOx; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> detection	rIgG	500–2000	330	(Hernández-Santos et al. 2002)
Anti-IgG-biotin-avidin-SPCE	Adsorption of streptavidin on pre-oxidized SPCE; immobilization of biotinylated anti-IgG	CV; SWV	Competitive; IgG-AP; 3-indoxyl-phosphate as AP substrate	rIgG	7–140	7	(Hu et al. 2003)
<i>H.py</i> -IgG GSPE	<i>H.py</i> -IgG immob. onto preoxidized GSPE	FIA-SWV E = -0.15 V	Competitive; anti-hIgG-AP; p-APP as AP substr.	<i>H.py</i> -IgG/serum	0–100 U mL <sup>-1</sup>	0.5 U mL <sup>-1</sup>	(Li et al. 2006)
Anti-IgG-IrE	Anti-IgG immobilization on electrochemically growth oxide matrix	Amperom. E = + 0.42 V	Sandwich; anti-IgG-AP; HQDP as AP substr.; HQ detection	hIgG, transferrin	10 200 (IgG)	8	(Liang and Mu 2006)
Anti-IgG-ZnO/chitosan-GCE	Anti-IgG immobilization onto ZnO/chitosan-modified GCE	Amperom. E = -0.15 V	Sandwich; anti-IgG-HRP; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> detection; HQ as mediator	hIgG	2.5–500	1.2	(Liu et al. 2006)
CNTs-pSf-IgG/SPE	Incorp. of IgG to the CNTs-pSf composite membrane	Amperom. E = -0.10 V	Competitive; anti-IgG-HRP; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> detection; HQ as mediator	Anti-IgG	(2–5) × 10 <sup>3</sup>	1660	(Mena et al. 2005)

By: M. J. C. 12 February 2008

Anti-mIgG-CNTs array	CNTs activation; EDCNHS covalent immobilization of anti-mIgG	EIS	Incub. in mIgG	mIgG	Upto $100 \times 10^3$	200	(Messina et al. 2007)
Anti-IgG-Au <sub>coll</sub> -AET-AuE	Prep. of Au <sub>coll</sub> -AET (SAM) modified AuE; adsorption of anti-IgG	EIS; CV; potentiom.	Measurement of potential changes in the presence of IgG	IgG/serum	12–800	3.4	(Pemberton et al. 2001)
Anti-hIgG-Au <sub>coll</sub> -HDT-AuE	Prep. of Au <sub>coll</sub> -HDT (SAM) modified AuE; adsorption of rabbit anti-hIgG	EIS	Incub. in: a) hIgG, b) goat anti-hIgG-Au <sub>coll</sub> . Amplif. by immers. in rabbit anti-gIgG-Au <sub>coll</sub>	hIgG	15.3–328.3	4.1	(Sánchez et al. 2007)
Anti-hIgG-CPE	Anti-hIgG adsorption onto electro-oxidized CPE surface	ASV	Sandwich; incub. in a) hIgG, b) anti-hIgG- Au <sub>coll</sub> oxidation at +1.30 V; voltammetry	hIgG	10–500	4	(Tang et al. 2005)
Anti-IgG(CdFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> SiO <sub>2</sub> )-CPE	immobil. anti-IgG by cross-linking with GH on APTES-pretreated CdFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> particles; attach bioparticles to CPE surface	Amperom. E = -0.30 V	Sandwich; anti-hIgG-HRP; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> detection; HQ as mediator	hIgG	510–30170 (i vs. log C)	180	(Vijayavardhana et al. 2002)

Amperometric IgG Immunosensor

AET, mercaptoethylamine; CPE, carbon paste electrode; GH, glutaraldehyde; GSPE, graphite screen-printed electrode; HDT, 1,6-hexanedithiol; *H.py*, *Helicobacter pylori*; HQ, hydroquinone; pSf, poly sulfone; SPCE, screen-printed carbon electrode; TCAP, 5,2,':5'2"-terthiophene-3"-carboxylic polymer.

reported (Wang et al. 2006). Regarding the use of nanomaterials, carbon nanotubes/polysulfone-modified screen printed electrodes have been used as a matrix for the incorporation of IgG and amperometric detection by competitive assay using HRP as the anti-IgG label (Sánchez et al. 2007). A CNT-array immunosensor has been constructed for the determination of mouse-IgG using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) (Yun et al. 2007). Immobilization of anti-IgG on Au-colloid-modified mercaptoethylamine SAMs was investigated, and the change that occurs in the presence of the corresponding antigen was potentiometrically monitored (Fu et al. 2005). Colloidal gold has been also used as a label to enhance sensitivity. For example, a highly sensitive electrochemical impedance immunosensor for human IgG with signal amplification based on a colloidal gold labeled anti-IgG complex was developed (Chen et al. 2006). This strategy has been also used for the preparation of a carbon paste immunoelectrode based on adsorptive voltammetry of the adsorbed  $\text{AuCl}_4^-$  (Chen et al. 2007). Other nanoparticles, such as core-shell magnetic nanoparticles ( $\text{CdFe}_2\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ) modified with surface amino groups have also been used for immobilization of anti-IgG on carbon paste electrodes and amperometric sensing of IgG by a sandwich assay using the anti-IgG-HRP conjugate and hydroquinone as the mediator (Liu et al. 2006).

In this article, colloidal gold nanoparticles were incorporated into a Tyrosinase-graphite-Teflon composite electrode, which constitutes both an appropriate matrix for the immobilization of anti-IgG and a sensitive amperometric transducer. A sandwich-type configuration using alkaline phosphatase (AP)-labeled anti-IgG (anti-IgG-AP) was used to determine IgG. Phenyl phosphate was employed as the AP substrate, and the enzyme reaction product, phenol, was catalytically oxidized by tyrosinase to the *o*-quinone, which was electrochemically reduced at the biocomposite electrode.

## EXPERIMENTAL

### Reagents and Solutions

Antirabbit immunoglobuline G (anti-IgG), rabbit immunoglobulin (IgG), antirabbit immunoglobulin G labeled with alkaline phosphatase (anti-IgG-AP), and protein A (*S. aureus*) were obtained from Sigma. Tyrosinase (Tyr, from mushroom, EC 1.14.18.1, activity of 5370 units per mg of solid) (Sigma) and phenyl phosphate disodium salt dihydrate (Sigma, 98%) were also used. Bovine serum albumin (BSA) (97%) and magnesium chloride (99%) were all from Merck. Phenol (Scharlab, 99%), and TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Sigma, 99%) were also used.  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  stock solutions of antiIgG and IgG were prepared in 0.135 M NaCl and 0.150 M NaCl solutions, respectively. More diluted solutions, and  $0.13 \text{ mg l}^{-1}$  anti-IgG-AP were prepared daily by dilution with 0.1 M TRIS (pH 7.0)-1 mM

MgCl<sub>2</sub> buffer solution. Solutions of 2% protein A, 2% BSA, 0.01 M phenol, and 0.01 M phenyl phosphate were prepared in 0.1 M TRIS (pH 7.0)-1 mM MgCl<sub>2</sub> buffer solution.

Colloidal gold was prepared as reported earlier (Mena et al. 2005). Briefly, 2.5 ml of 1% sodium citrate solution was added to 100 ml of a boiling aqueous solution containing 1 ml 1% (w/w) HAuCl<sub>4</sub> (Sigma, >49% as Au). The diameter of gold nanoparticles, measured by electron scanning microscopy, was  $16 \pm 2$  nm. Graphite powder (Ultra Carbon, Bay City, MI, USA) and Teflon powder (Aldrich) were also used for the construction of the composite electrode.

### Apparatus and Electrodes

Electrochemical measurements were performed using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab, with the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.) electrochemical software. A three-electrode cell (a BAS VC-2 10 ml glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode, a BAS MF-2063 Ag/AgCl/3M KCl reference electrode, and the immunosensor as the working electrode, was used. All experiments were performed at room temperature. Electrochemical impedance measurements were performed using a  $\mu$ -Autolab type III with FRA2 software (Ecochemie).

### Procedures

#### Preparation of the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon Electrode

Tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon bioelectrodes were constructed as described previously (Carralero et al. 2006). Briefly, 150 mg graphite and 900  $\mu$ l of the colloidal gold suspension prepared as described above were thoroughly mixed by mechanic stirring for 2 h. Then, water was evaporated under air current at room temperature. Next, 34.75 mg tyrosinase and 400  $\mu$ l of 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer solution of pH 7.4 were incorporated to the mixture by stirring for 2 h in an ice bath. The resulting mixture was dried and 415.25 mg of Teflon powder was added and thoroughly mixed by hand. Then, the mixture was pressed into pellets by using a Carver pellet press (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) at 10,000 kg cm<sup>-2</sup> for 10 min. These pellets were 1.3 cm in diameter and approximately 0.4 cm thick. From this main pellet, several (five or six) 3.0 mm diameter cylindrical portions were bored, each portion constituting a different composite electrode. Each electrode was press-fitted into a Teflon holder, and the electrical contact was made through a stainless steel screw.

### Immunosensor Preparation

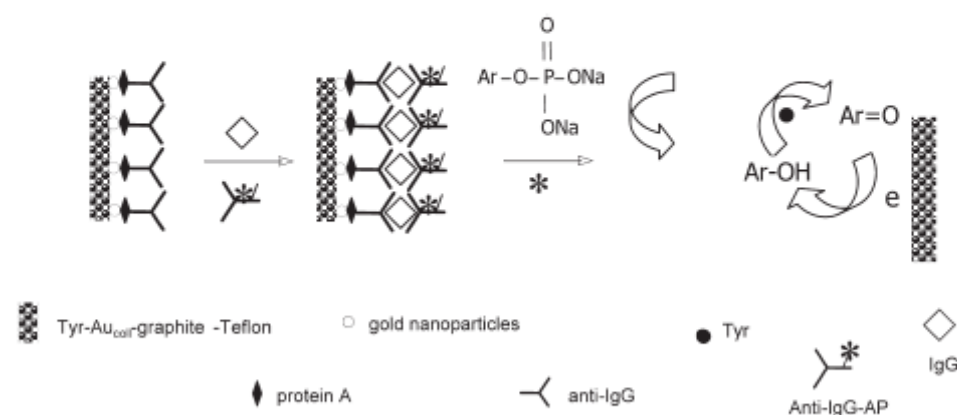
The tyrosinase composite biosensor was incubated into a 2% solution of Protein A for 20 min. Then, 2.6  $\mu\text{l}$  of a 0.11  $\text{mg ml}^{-1}$  anti-IgG solution was deposited on the bioelectrode surface and allowed to dry in air at room temperature. The resulting anti-IgG-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) electrode was immersed for 15 min in a 2% (w/w) BSA solution and washed carefully with 0.1 M TRIS buffer, pH 7.0. Once prepared, the anti-IgG(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor was immersed in 10 ml of the analyte IgG solution for 35 min. Then, it was incubated in 10 ml of a 1700  $\text{ng ml}^{-1}$  anti-IgG-AP solution for 40 min.

### Electrochemical Detection of IgG

The immunosensor was immersed in the electrochemical cell containing 10 ml of a 0.1  $\text{mol l}^{-1}$  TRIS buffer, pH 7.0 and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Then, phenyl phosphate in a 2  $\mu\text{M}$  concentration was added, and the amperometric measurement of the *o*-quinone reduction current was carried out at  $-0.1$  V versus Ag/AgCl.

## RESULTS AND DISCUSSION

The immunosensor design is schematized in Fig. 1. It is based on a sandwich configuration with the antibody (anti-IgG) immobilized onto the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon composite bioelectrode. The immunosensor is incubated in the analyte solution and then in anti-IgG-AP. The addition of phenylphosphate as AP-substrate generates phenol, which is oxidized by Tyr to the *o*-quinone.

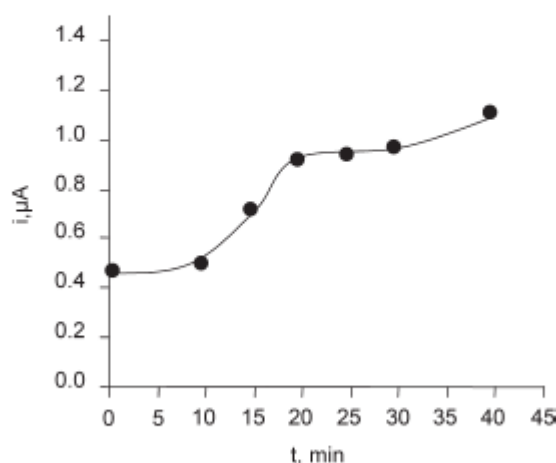


**Figure 1.** Schematic diagram of the IgG sandwich-type immunosensor based on electrochemical detection at a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon electrode: Ar = OH, phenol; Ar = O, *o*-quinone.

Therefore, monitoring of the affinity reaction was performed by the amperometric detection of the *o*-quinone.

### Optimization of the Variables Involved in the Immunosensor Preparation

The anti-IgG immobilization on the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon composite electrode was accomplished using two different strategies. The antibody was adsorbed to the electrode surface, making use of the gold nanoparticle's capability of adsorbing proteins without any loss of activity, and also it was immobilized by means of its interaction through Protein A. In principle, when the antibodies are immobilized through Protein A, their Fab binding sites are mostly oriented away from the solid phase, and so, the binding sites are more available for immunological reactions than when the antibodies are randomly adsorbed onto the electrode surface (Zacco et al. 2004). In order to study the effect of the presence of Protein A, various immunosensors were prepared by immersion of the bioelectrode in a 2% Protein A solution for different periods of time in the 10–40 min range. Then, anti-IgG was immobilized in each Protein A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon bioelectrode, and the immunoassay was performed as indicated in the experimental section. For comparison, a configuration was also prepared in absence of Protein A. Figure 2 shows an increase in the measured current with incubation time in the Protein A solution, followed by a plateau. Furthermore, it can be observed as the signal was higher when sufficient incubation in protein A was accomplished when compared with the direct adsorption of anti-IgG on the bioelectrode surface. Thus, although this direct adsorption is feasible, the



**Figure 2.** Effect of the incubation time in a 2% protein a solution on the amperometric response of an anti-IgG-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon immunosensor. Experimental conditions as in Table 2;  $E_{app} = -0.10$  V.

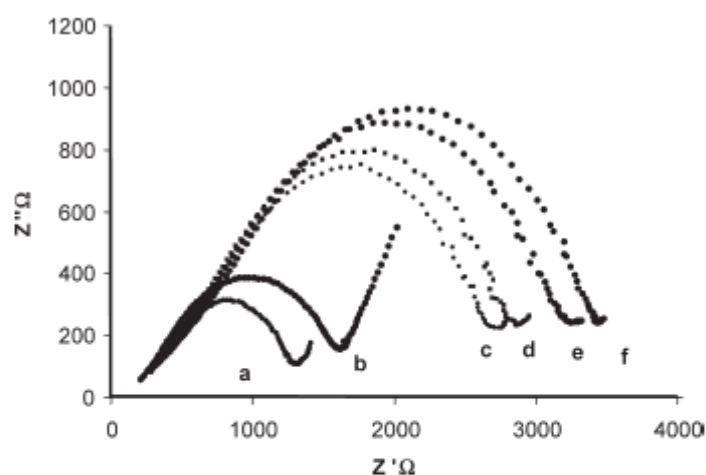
inherent advantages to the use of protein A for the immobilization of antibodies led to an improvement of the binding efficiency. The reproducibility of the measurements obtained with 5 different immunosensors incubated 20 min in protein A was remarkably better than that for the other 5 immunosensors constructed by the direct adsorption of the antibodies with RSD values of 4.8 and 14.3%, respectively. Accordingly, 20 min were chosen as the incubation time.

Both the amount of anti-IgG attached to the electrode surface and the immersion time in the BSA solution to minimize nonspecific adsorption were optimized. Regarding antibody loading, amounts ranging between 0 to 5  $\mu\text{g}$  were investigated. The resulting immunosensors were tested against an 80  $\text{ng ml}^{-1}$  IgG solution with 40 min incubation in 10 ml of 1700  $\text{ng ml}^{-1}$  anti-IgG-AP solution. Maximum current was reached at 2.8  $\mu\text{g}$  antibody, and then the amperometric response decreased which could be attributed to the inactivation of the antibody binding sites by steric hindrance (Carralero et al. 2007b). Concerning the incubation in BSA, various immunosensors were prepared by their immersion in 0, 2, 5 or 10% BSA solutions for 15 min. The immunosensors were used to measure solutions containing 80  $\text{ng ml}^{-1}$  IgG as well as a blank solution in the absence of IgG. The immunosensor's response decreased in both cases as the BSA concentration increased. A very small resulting background signal was observed with BSA incubation, demonstrating that BSA blocked efficiently the electrode surface and avoided the non-specific adsorptions of anti-IgG-AP. Thus, a concentration of 2% BSA was selected for all subsequent experiments.

Figure 3 shows the Nyquist plots obtained for Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (a), Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (b) anti-IgG-ProtA-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (c), BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (d), IgG-BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (e) and anti-IgG-AP IgG-BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon (f) electrodes. All measurements were performed using a 5 mM  $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)/5$  mM  $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$  solution prepared in KCl 0.1 M, with frequencies between 0.1 and 10 kHz. Each curve contains a semicircle portion at higher frequencies whose diameter increased with the number of components immobilized. It is well known that the diameter is related to the electron-transfer resistance of the layer. Obviously, the electron transfer of the redox couple was hindered by the presence of biomolecule coatings on the electrode surface. The increasing value of the semicircle diameter with each immobilization step confirmed that the different coatings of biomolecules were assembled on the electrode surface. Values of  $R_{\text{ct}}$  were 1040, 1490, 2239, 2462, 2758, and 2948  $\Omega$ , respectively.

### Optimization of the Immunosensor Performance

The potential and pH values employed for the detection of the enzymatically generated *o*-quinone were the same used as in previous papers. The use of a composite Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor as an amperometric

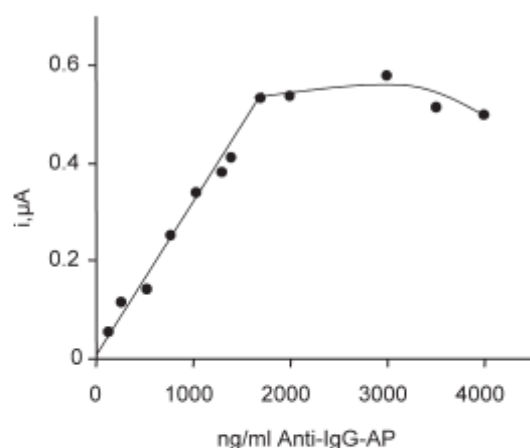


**Figure 3.** Nyquist plots obtained for: (a) Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon; (b) Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon; (c) anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon; (d) BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon; (e) IgG-BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon; (f) anti-IgG-AP-IgG-BSA-anti-IgG-Prot A-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon. 5 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>] -5 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) in 0.1 M KCl.

transducer allowed sensitive responses to be obtained at  $-0.10$  V (Carralero et al. 2006). Moreover, pH 7 was selected as the optimum value to achieve high amperometric responses and the best performance of both Tyr and AP enzyme reactions (Carralero et al. 2007b).

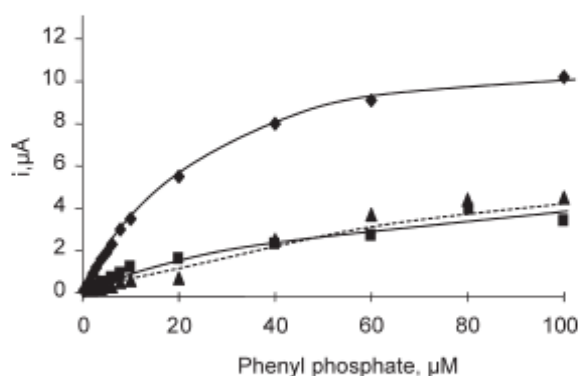
The amperometric response of the immunosensor depends on the amount of immobilized anti-IgG-AP. In order to optimize this variable, the immunosensor was incubated in solutions containing different concentrations of anti-IgG-AP. As shown in Fig. 4, the current increased up to  $1700 \text{ ng ml}^{-1}$  and then levelled off. A slight decrease of the current was observed for higher concentrations. Thus, a concentration of  $1700 \text{ ng ml}^{-1}$  anti-IgG-AP was selected. The effect of the incubation time in the anti-IgG-AP solution was also examined in the 5–60 min. range. A fast increase of the immunosensor response for  $80 \text{ ng ml}^{-1}$  IgG was produced when the incubation time varied from 15 to 40 min, then levelled off for longer times, whereas the blank solution did not give a significant signal. Accordingly, 40 min was selected as the time used for the formation of the immuno complexes.

In order to obtain the highest sensitivity, the effect of the incubation time in an  $80 \text{ ng ml}^{-1}$  IgG solution was also investigated. The current increased sharply with the time of immersion up to 35 min, hence, this period of time was used for all subsequent experiments. The influence of the concentration of phenyl phosphate used as the AP substrate, in the  $0-100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  range, on the immunosensor amperometric response was also evaluated. The results obtained have been represented in Fig. 5 as well as those corresponding to the use of an immunosensor incubated in a TRIS buffer solution without IgG, and also those obtained at a Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor. In



**Figure 4.** Effect of the Anti-IgG-AP concentration on the amperometric response of the immunosensor. Other variables as in Table 2;  $E_{\text{app}} = -0.10$  V.

the presence of IgG, the current increased with the AP-substrate concentration up to a region of saturation which appeared at  $60 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Without IgG, significant currents were also observed, which increased with the phenyl phosphate concentration. This background current could not be attributed to unspecific adsorption of anti-IgG-AP, because it is avoided by blocking with BSA. Moreover, a similar response was also observed at the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor. Therefore, this fact, which has been also observed in previous investigations (Pemberton et al. 2001; Carralero et al. 2007b), has been attributed to the presence of traces of free phenol in the phenyl phosphate reagent. The use of a substrate concentration in the saturation zone is desirable to ensure that the enzyme reaction rate depends



**Figure 5.** Influence of the phenyl phosphate concentration on the amperometric response obtained with an anti-IgG-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor incubated in: (◆) 0.1 M TRIS buffer solution of pH 7.0 containing  $80 \text{ ng ml}^{-1}$  IgG; (▲) 0.1 M TRIS buffer solution of pH 7.0 without IgG, and with an (■) Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor;  $E_{\text{app}} = -0.10$  V.

only on the enzyme concentration (Fernández-Sánchez and Costa-García 1997). In this work, the phenyl phosphate concentration was selected by considering the ratio between the amperometric response obtained with the immunosensor and the current observed at the Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon biosensor (Carralero et al. 2007b), with the aim of avoiding high background currents, the best signal-to-background current ratio was found for 2  $\mu$ M phenyl phosphate and, accordingly, this concentration was chosen for further work. Moreover, this concentration value ensures a sufficient AP-substrate excess for an adequate monitoring of the affinity reaction.

All the experimental conditions optimized in these studies have been summarized in Table 2.

### Analytical Characteristics of the Electrochemical Immunosensor

The amperometric current increases linearly with the IgG concentration up to 100 ng ml<sup>-1</sup>, and the saturation level was reached at  $\sim$ 200 ng ml IgG. Furthermore, the steady-state currents were obtained in 2–3 min after the addition of phenyl phosphate. The analytical characteristics of the calibration graph are summarized in Table 3. The sensitivity achieved with this configuration compares advantageously with that obtained using other electrochemical immunosensor designs (see Table 1). For example, the slope of the linear portion of the calibration graph,  $m = 11.8 \text{ nA ng}^{-1} \text{ ml}$ , is approximately 67-fold higher than that obtained with an anti-IgG-biotin-avidin-HRP-TCAP-SPCE configuration (Darain et al. 2003). The limit of detection was calculated according to the  $3s_b/m$  criterion, where  $s_b$  was estimated as the standard deviation ( $n = 10$ ) of the amperometric signals corresponding to different IgG solutions at the lowest concentration level of the calibration graph. The obtained value, 2.6 ng ml<sup>-1</sup>, is remarkably lower than values reported for the other IgG electrochemical immunosensors (see Table 1). For example, it is almost 640-fold lower than the detection limit achieved with the CNTs-pSf-IgG/SPE immunosensor (Sánchez et al. 2007). Also for comparison purposes, a calibration plot for IgG was obtained using an immunosensor prepared in the absence of gold nanoparticles. As Table 3 shows, this calibration exhibited both a shorter linear range and an almost three-fold lower

**Table 2.** Experimental conditions for the preparation of anti-IgG-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor and immunoassay

Parameter	Protein A	Anti-IgG	BSA	IgG	Anti-IgG-AP	Phenyl phosphate
Incubation time, min	20	—	15	35	40	—
Concentration	2%	0.11 mg ml <sup>-1</sup> (2.6 $\mu$ l)	2%	Variable	1700 ng ml <sup>-1</sup>	2 $\mu$ M

**Table 3.** Analytical characteristics of the calibration graphs for IgG

Parameter	Anti-IgG-(Tyr-Au <sub>coll</sub> -graphite-Teflon)	Anti-IgG-(Tyr-graphite-Teflon)
Linear range, ng ml <sup>-1</sup>	5–100	10–65
Slope, nA ml ng <sup>-1</sup>	11.8 ± 0.5	4.6 ± 0.4
Intercept, nA	0.158 ± 0.003	0.13 ± 0.02
<i>r</i>	0.992	0.990
LOD (3s <sub>b</sub> /m), ng ml <sup>-1</sup>	2.6	4.1

slope value than those obtained with the gold nanoparticles-modified biosensor. This demonstrates that the role of gold nanoparticles for both efficient immobilization of the biomolecules and improved electrochemical transduction makes possible an improved performance of the immunosensor design with respect to other immunosensor configurations for IgG.

Different aspects related with operational stability of the IgG immunosensor were evaluated. First, repetitive amperometric measurements ( $n = 10$ ) for an IgG concentration of 80 ng ml<sup>-1</sup> were carried out with the same immunosensor after the addition of phenyl phosphate. The relative standard deviation (RSD) for the steady state current was 3.3%. The amperometric responses obtained with 10 different immunosensors prepared on different days, for the same IgG concentration, gave a RSD value of 4.5%, which demonstrated the good reproducibility achieved in the construction of the nanostructured immunosensors. The lifetime of a single anti-IgG-(Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon) immunosensor was evaluated by performing daily three measurements of 10 ng ml<sup>-1</sup> IgG. After use, the immunosensor was stored under dry conditions at 4°C. The responses did not vary from  $\pm 3 \times$  the standard deviation of the measurements performed in the first day, during 16 days with no need for any regeneration procedure to the immunosensor surface as well as any further incubation step. This fairly good immunosensor stability can be attributed to the demonstrated capability of gold nanoparticles to adsorb proteins with preserved biological activity. In fact, when a similar immunosensor was prepared in the absence of gold nanoparticles (anti-IgG-(Tyr-graphite-Teflon), a poorer repeatability, RSD = 5.2% ( $n = 10$ ), and a shorter lifetime, 5 days, were obtained.

The analytical usefulness of the anti-IgG-Tyr-Au<sub>coll</sub>-graphite-Teflon immunosensor was evaluated by determining immunoglobulin G in a rabbit serum sample (Uptima, Interchim) which did not contain the antibody, and that was spiked at a 10 ng ml<sup>-1</sup> concentration level. The immunosensor was directly incubated in the spiked serum similarly to that described for standard IgG solutions. A calibration graph constructed with serum samples spiked at different concentration levels was used to interpolate the signal. A mean concentration ( $n = 5$ ) of  $10.3 \pm 0.6$  ng ml<sup>-1</sup> was obtained, or a recovery of  $103 \pm 6\%$ , thus demonstrating the good performance of the immunosensor for the rapid analysis of serum samples.

## CONCLUSIONS

The use of a composite biosensor modified with gold nanoparticles allows the development of an IgG immunosensor that exhibits improved analytical performance, in terms of sensitivity and stability, compared with other IgG electrochemical immunosensor designs. The role of gold nanoparticles has been demonstrated to be significant for both protein immobilization on the bioelectrode surface and to achieve enhanced amperometric responses. This biosensor design is fairly adaptable for the sensitive detection of other analytes based on the use of immunological reactions.

## REFERENCES

- Carralero, V., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J.M. 2007a. Development of a progesterone immunosensor based on a colloidal gold-graphite-Teflon composite electrode. *Electroanalysis*, 19: 853–858.
- Carralero, V., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J.M. 2007b. Nanostructured progesterone immunosensor using a tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon biosensor as amperometric transducer. *Anal. Chim. Acta*, 596: 86–91.
- Carralero, V., Mena, M.L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J.M. 2006. Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite-Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 730–736.
- Chen, H., Jiang, J.H., Huang, Y., Deng, T., Li, J.S., Shen, G.L., and Lu, R.Q. 2006. An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex. *Sens. Actuat., B*, 11: 211–218.
- Chen, H., Jiang, J.H., Huang, Y., Deng, T., Li, J.S., Shen, G.L., and Yu, R.Q. 2006. An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex. *Sens. Actuators B*, 117: 211–218.
- Chen, J., Yan, F., Tan, F., and Ju, H. 2006. Gold nanoparticles doped three-dimensional sol-gel matrix for amperometric human chorionic gonadotrophine immunosensor. *Electroanalysis*, 18: 1696–1702.
- Chen, Z.P., Peng, Z.F., Zhang, P., Jin, X.F., Jiang, J.H., Zhang, X.B., Shen, G.L., and Yu, R.Q. 2007. A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label. *Talanta*, 72: 1800–1804.
- Darain, F., Park, S.U., and Shim, Y.B. 2003. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screenprinted electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 18: 773–780.
- Díaz-González, M., Hernández-Santos, D., and González-García, B. 2005. Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin screen-printed carbon electrodes. *Talanta*, 65: 565–573.
- Fernández-Sánchez, C. and Costa-García, A. 1997. Adsorption of immunoglobulin G on carbon paste electrodes as a basis for the development of immunoelectrochemical devices. *Biosens. Bioelectron.*, 12: 403–413.
- Fu, X., Yuan, R., Tang, D., Chai, Y., and Xu, L. 2005. Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via potentiometric immunosensor,

- cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques. *Colloids Surf. B*, 40: 61–66.
- Fu, Y., Yuan, R., Tang, D., Chai, Y., and Xu, L. 2005. Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via potentiometric immunosensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques. *Colloid Surf. B*, 40: 61–66.
- Hernández-Santos, D., González-García, M.B., and Costa-García, A. 2002. Metal-nanoparticles based electroanalysis. *Electroanalysis*, 14: 1225–1235.
- Hu, S.Q., Xie, J.W., Xu, Q.H., Rong, K.T., Shen, G.L., and Yu, R.Q. 2003. A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for detection of paraoxon. *Talanta*, 61: 769–777.
- Li, X., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, L., Zhuo, Y., and Zhang, Y. 2006. Amperometric immunosensor based on toluidine blue/nano-Au through electrostatic interaction for determination of carcinoembryonic antigen. *J. Biotechnol.*, 123: 356–366.
- Liang, R. and Mu, W.J. 2006. Flow-injection immuno-bioassay for interleukin-6 in humans based on gold nanoparticles modified screen-printed graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 580: 128.
- Liu, Z.M., Yang, H.F., Li, Y.F., Liu, Y.L., Shen, G.L., and Yu, R.Q. 2006. Core-shell magnetic nanoparticles applied for immobilization of antibody on carbon paste electrode and amperometric immunosensing. *Sensor Actuators B*, 113: 956–962.
- Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J.M. 2005. A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Biochem.*, 336: 20–27.
- Messina, G.A., De Vito, I.E., and Raba, J. 2007. Screen-printed immunosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Sensor Actuators B*, 128: 23–30.
- Pemberton, R.M., Hart, J.P., and Mottram, T.T. 2001. An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system. *Biosens. Bioelectron.*, 16: 715–723.
- Sánchez, S., Pumera, M., and Fábregas, E. 2007. Carbon nanotube/polysulfone screen-printed electrochemical immunosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 23: 332–340.
- Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Fu, Y., Dai, J., Liu, Y., and Zhong, X. 2005. New amperometric and potentiometric immunosensors based on gold nanoparticles/tris(2,2-bipyridyl) cobalt(III) multilayer films for hepatitis B surface antigen determinations. *Biosens. Bioelectron.*, 21: 539–548.
- Vijayavardhara, C.A., Halsall, H.B., and Heineman, W.R. 2002. In *Electroanalytical Methods for Biological Materials*; Brajter-Toth, A. and Chambers, J.Q. (eds.); Marcel Dekker: New York, p. 329.
- Wang, Z., Yang, Y., Li, J., Gong, J., Shen, G., and Yu, R. 2006. Organic–inorganic matrix for electrochemical immunoassay: detection of human IgG based on ZnO/chitosan composite. *Talanta*, 69: 686–690.
- Wilson, M.S. and Rauh, R.D. 2004. Novel amperometric immunosensors based on iridium oxide matrices. *Biosens. Bioelectron.*, 19: 693–699.
- Yun, Y.H., Bange, A., Heineman, W.R., Halsall, H.B., Shanov, V.N., Dong, Z., Pixley, S., Behbehani, M., Jazieh, A., Tu, Y., Wong, D.K.Y., Bhattacharya, A., and Schulz, M.J. 2007. A nanotube array immunosensor for direct electrochemical detection of antigen–antibody binding. *Sens. Actuators B*, 123: 177–182.

**Amperometric IgG Immunosensor**

259

- Zacco, E., Pividori, M.I., Llopis, X., Valle, M., and Alegret, S. 2004. Renewable protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing. *J. Immunol. Meth.*, 286: 35–46.
- Zhuo, Y., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, Y., Li, X., Wang, N., and Zhu, Q. 2006. Amperometric enzyme immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and thionine on Nafion modified electrode surface for  $\alpha$ -1-fetoprotein determinations. *Sensor Actuator B*, 114: 631–639.

---

# *CONCLUSIONES*

---

A partir de los resultados obtenidos y descritos en la Memoria de esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- El empleo de superficies electródicas modificadas con nanopartículas de oro permite desarrollar biosensores electroquímicos con mejores características analíticas que en ausencia de las mismas. Los procedimientos de inmovilización de las nanopartículas bien por electrodeposición (electrodo de carbono vitrificado), bien por incorporación del oro coloidal en la matriz compósita (electrodo grafito-Teflón), han permitido llevar a cabo la modificación de diferentes electrodos de una forma rápida y reproducible, obteniéndose el tamaño de las nanopartículas deseado.

2.- La combinación de las ventajas de utilizar una matriz compósita de grafito-Teflón para la inmovilización de enzimas y la incorporación de las nanopartículas de oro en dicha matriz, ha permitido desarrollar un biosensor de tirosinasa con excelentes características analíticas, mejorando los límites de detección alcanzados con otras configuraciones descritas en la literatura. Se ha comprobado que la presencia de oro coloidal, aumenta tanto la cinética de la reacción implicada en el proceso de reconocimiento bioquímico como la de la reacción base del proceso de transducción electroquímica, consiguiéndose una gran sensibilidad en la detección de compuestos fenólicos. Además, la fácil regeneración de la superficie sensora mediante simple pulido, junto con la capacidad de las nanopartículas de oro de retener la actividad biológica de las proteínas, ha permitido construir un biosensor reutilizable y reproducible con una gran estabilidad en el tiempo.

3.- Las inherentes propiedades ventajosas de los electrodos de grafito-Teflón modificados con oro coloidal fueron aprovechados para el desarrollo de diferentes inmunosensores electroquímicos novedosos. El inmunosensor de progesterona basado en la inmovilización de anti-progesterona sobre la superficie

de grafito-Teflón nanoestructurada, ha ofrecido importantes ventajas analíticas con respecto a otros inmunosensores encontrados en la bibliografía. De este modo, se consiguió mejorar tanto el rango de linealidad como la sensibilidad obtenida para la determinación de progesterona. La utilización de un biosensor compuesto de tirosinasa modificado con nanopartículas de oro como transductor amperométrico de la reacción de afinidad, ha permitido disminuir el potencial de detección para la determinación de progesterona, aumentando aún más la sensibilidad y mejorando los límites de detección alcanzados para la determinación de dicho analito. Además, la buena repetibilidad de las medidas y la aceptable reproducibilidad alcanzada en su fabricación hace de estos inmunosensores una perfecta herramienta para llevar a cabo la detección de cambios en la concentración de progesterona a niveles fisiológicos de interés para estudios de fertilidad en las vacas. Por otra parte, el empleo de este biosensor para desarrollar un inmunosensor de inmunoglobulina G ha permitido alcanzar una gran sensibilidad y estabilidad comparado con otros inmunosensores reportados en la bibliografía. La incorporación de las nanopartículas de oro ha demostrado una vez más su adecuación para inmovilizar biomoléculas de forma eficiente, así como su capacidad para producir una amplificación de la respuesta amperométrica.

4.- Todos los resultados obtenidos demuestran la utilidad analítica y la versatilidad de los biosensores desarrollados. Los valores de las desviaciones estándar relativas, tanto para la repetibilidad de las medidas como para la reproducibilidad entre distintos biosensores, han resultado ser en todos los casos inferiores al 10%, lo que demuestra la fiabilidad del proceso de fabricación de cada uno de los biosensores enzimáticos e inmunosensores.

5.- Finalmente, los biosensores desarrollados se han aplicado a la determinación de los analitos correspondientes en muestras reales o en muestras enriquecidas a

niveles de concentración de interés. Así, por lo que respecta a los biosensores enzimáticos, se ha llevado a cabo la estimación del contenido total de polifenoles en vinos y de compuestos fenólicos en aguas procedentes de una refinería y en muestras de alpechín. Los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por otras técnicas habitualmente empleadas para tales fines, obteniéndose una buena correlación entre las distintas metodologías.

6.- Con respecto a los inmunosensores, se ha determinado el contenido de progesterona en muestras de leche enriquecidas, así como de inmunoglobulina G en sueros. Los estudios de recuperación realizados en muestras enriquecidas, resultaron muy satisfactorios, siendo dichos porcentajes de recuperación próximos al 100% en todos los casos. De esta forma, ha quedado demostrado la aplicabilidad de estos biosensores para la determinación de los analitos en muestras reales, proporcionando una serie de ventajas como son la rapidez de respuesta, el bajo coste, facilidad de la fabricación y conservación, minimización del número de interferencias, así como la posibilidad de miniaturización, pudiéndose realizar medidas rápidas e "in situ", a diferencia de otras técnicas analíticas que requieren un mayor tiempo de análisis, un mayor coste y un pretratamiento de la muestra.

---

# *BIBLIOGRAFÍA*

---

- [Agüí, 2004]: Agüí L., Manso J., Yáñez-Sedeño P. y Pingarrón J.M. (2004). Colloidal-gold cysteamine-modified carbon paste electrodes as suitable electrode materials for the electrochemical determination of sulphur-containing compounds. Application to the determination of methionine. *Talanta* 64: 1041-1047
- [Agüí, 2006]: Agüí, L., Manso, J., Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M. (2006) Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes. *Sensor Actuat. B-Chem.* 113: 272-280
- [Albuquerque, 2007]: Albuquerque Y.D. y Ferreira L.F. (2007). Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 596 (2): 210-221
- [An, 2007]: An, H.Z., Yuan, R.T., Tang, D.P., Chai, Y. y Li, N. (2007). Dual-amplification of antigen-antibody interactions via backfilling gold nanoparticles on (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane sol-gel functionalized interface. *Electroanal.* 19(4): 479-486
- [APHA, 1981]: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. American Public Health Association. Washington, DC. 15<sup>th</sup> edn., 1134
- [APHA, 1985]: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. American Public Health Association. Washington, DC 16<sup>th</sup> edn., part 510
- [Banks, 2005]: Banks C.E. y Compton R.G. (2005). Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: an edge plane pyrolytic graphite electrode study. *Analyst* 130: 1232-1239
- [Bard, 2001]: Bard A.J., Faulkner L.R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [Brett, 2006]: Crespilho, F.N., Ghica, M.E., Florescu, M., Nart, F.C., Oliveira Jr., O.N. y Brett, C.M.A. (2006). A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochemistry Communications* 8: 1665-1670
- [Cai, 2001]: Cai H., Xu C., He P. Y Fang Y. (2001): Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *J. Electroanal. Chem.*, 510:78-85
- [Campanella, 2006]: Campanella L., Gregori E. Y Tomassetti M. (2006). Salicylic acid determination in cow urine and drugs using a bienzymatic sensor. *J. Pharm. Biom. Anal.* 42(1): 94-99
- [Campanella, 2004]: Campanella L., Bonanni a., Finotti E. Y Tomassetti M. (2004). Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity or red and

white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosen. Bioelectron.* 19: 641-651

[**Campuzano, 2003**]: Campuzano S., Serra B., Pedrero M. Villena F.J. y Pingarrón J.M. (2003). Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors. *Anal. Chim. Acta* 494 (1-2): 187-197

[**Capannesi, 2000**]: Capannesi C., Palchetti I., Mascini M. Y Parenti A. (2000): Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection of phenols. *Biosen. Bioelectron.* 17: 1015-1023

[**Chang, 2002**]: Chang S.C., Rawson K. y McNeil C.J. (2002). Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. *Biosen. Bioelectron.* 17: 1015-1023

[**Chen H., 2006**]: Chen, H., Jiang, J-H., Huang, Y., Deng, T., Li, J.S., Li, G. y Yu, R.Q. (2006). An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex. *Sensor Actuat. B-Chem.* 117 (1): 211-218

[**Chen J., 2006**]: Chen. J., Tang. J., Yan. F. y Ju. H. (2006) A gold nanoparticles/ sol-gel composite architecture for encapsulation of immunoconjugate for reagentless electrochemical immunoassay. *Biomaterials* 27 (10): 2313-2321

[**Chen Z., 2005**]: Chen, Z, Jiang J., Shen, G. y Yu, R. (2005) Impedance immunosensor based on receptor protein adsorbed directly on porous gold film. *Anal. Chim. Acta* 553 (1-2): 190-195

[**Chen Z., 2007**]: Chen, Z.P, Peng, Z.F, Zhang, P., Jin, X.F., Jiang, J.H., Zhang, X.B., Shen, G.L. y Yu R.Q. (2007). A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label *Talanta* 72 (5): 1800-1804

[**Chu, 2005a**]: Chu, X., Xiang, Z.F., Fu, X., Wang, S.P., Shen, G.L. y Yu, R.Q (2005) Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for *Schistosoma japonicum* antibody detection. *J. Immunol. Methods* 301: 77-88

[**Chu, 2005b**]: Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G.L. y Yu, R.Q. (2005). An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosen. Bioelectron.* 20: 1805-1812

[**Chuang, 2006**]: Chuang M.C., Liu C.C. y Yang M.C. (2006). An electrochemical tyrosinase-immobilized biosensor for albumin-toward a potential total protein measurement. *Sen. Actuat. B: Chemical* 114 (1): 357-363

[**Claycomb, 1998**]: Claycomb R.W., Delwiche M.L., Munro C.J., BonDurant R.H., (1998). Rapid enzyme immunoassay for measurement of bovine progesterone. *Biosens. Bioelectron.* 13: 1165-1171

- [**Cosnier, 2001**]: Cosnier C., Szunerits S., Marks R.S., Lellouche L.P., y Perie K. (2001). Mediated electrochemical detection of catechol by tyrosinase-based poly(dicarbazole) electrodes. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50: 65-77
- [**Crespilho, 2006**]: Crespilho, F.N., Ghica, M.E., Florescu, M., Nart, F.C., Oliveira Jr., O.N. y Brett, C.M.A., (2006). A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer- gold nanoparticles electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochem. Commun.* 8: 1665-1670
- [**Çubukçu, 2007**]: Çubukçu, M., Timur, S. y Anik, Ülkü (2007). Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle y xanthine oxidase for xanthine y hypoxanthine detection. *Talanta* 3: 434-439
- [**Cummings, 2001a**]: Cummings E.A., Linquette-Mailley S., Mailley P., Cosnier S., Eggins B.R. y McAdams E.T. (2001). A comparison of amperometric screen-printed carbon electrodes and their application to the analysis of phenolic compounds present in beers. *Talanta* 55 (5): 1015-1027
- [**Cummings, 2001b**]: Cummings E.A., Eggins B.R., McAdams E.T., Linquette-Mailley S., Madigan D., Clements M. y Coleman C. (2001). Development of a tyrosinase-based screen-printed amperometric electrode for the detection of flavonoid polyphenols in lager beers. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59 (2): 84-89
- [**Dan, 2007**]: Dan, D., Xiaoxing, X., Shengfu, W. y Aidong, Z. (2007). Reagentless amperometric carbohydrate antigen 19-9 immunosensor based on direct electrochemistry of immobilized horseradish peroxidase. *Talanta* 71: 1257-1262
- [**Darain, 2003**]: Darain F., Park S-U y Shim Y-B. (2003). Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode *Biosens. Bioelectron* 18 (5-6): 773-780
- [**Dequaire, 2000**]: Dequaire M., Degrand C. y Limoges B. (2000). An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Anal Chem.* 72: 5521-5528.
- [**Díaz-González, 2005**]: Díaz-González M., Hernández-Santos D y González-García B (2005). Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin screen-printed carbon electrodes. *Talanta*, 65: 565-573
- [**Du, 2008**]: Du, D., Chena, S., Cai, J. y Zhang, A. (2008) Electrochemical pesticide sensitivity test using acetylcholinesterase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface. *Talanta* 74 (4): 766-772
- [**Ehrentreich-Förster, 2003**]: Ehrentreich-Förster E., Scheller F.W. y Bier F. F. (2003). Detection of progesterona in whole blood samples. *Biosens. Bioelectron.* 18: 375-380
- [**Escosura-Muñiz A., 2006**]: Escosura-Muñiz A., Gonzalez-García M.B y Costa-García A. (2006). Aurothiomalate as an electroactive label for the determination of

immunoglobulin M using glassy carbon electrodes as immunoassay transducers. *Sens and Act B: Chemical* 114(1): 473-481

[Feng, 2007]: Feng, H., Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Shen, G. y Yu, R., 2007. A Direct Electrochemical Biosensing Platform Constructed by Incorporating Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles onto Redox Poly(thionine) *Film. Anal. Sci.* 23: 235-239

[Fernández-Sánchez C., 2000]: Fernández-Sánchez C., González-García M.B Y Costa-García A. (2000). AC voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors. *Biosen. Bioelectron* 14 (12): 917-924

[Finot, 1999]: Finot M.O., Braybrook G.D. y McDermott M.T. (1999). Characterization of electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 466: 234-241

[Freire, 2002a]: Freire R.E., Duran N. Y Kubota L.T. (2002). Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. *J. Brazil Chem. Soc.* 13 (4): 456-462

[Freire, 2002b]: Freire R.S., Thongngamdee S., durán N., Wang J y Kubota L.T. (2002). Mixed enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. *Analyst.* 127: 58-261

[Freire, 2003]: Freire R.S., Pessoa C.A., Mello L.D., Kubota L.T. (2003). Dual amperometric biosensor device for analysis of binary mixtures of phenols by multivariate calibration using partial least squares. *Anal Chim. Acta* 485: 263-269

[Fu, 2007]: Fu, X.H., (2007). Electrochemical immunoassay for based on polythionine and gold glassy carbon electrodes carbohydrate antigen-125 hollow microspheres modified. *Electroanal.* 19(17): 1831-1839

[Fu., 2005]: Fu, Y., Yuan, R., Tang, D., Chai, Y y Xu, L. (2005). Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via potentiometric immunosensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques *Colloid Surface .B* 40 (1): 61-66

[Gao, 2007]: Gao, F., Yuan, R., Chai, Y., Chen, S., Cao, S. y Tang, T., (2007). Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on nano-Au/Thi/poly ( p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 70: 407-413

[Gomes, 2004]: Gomes S.A.S.S., Nogueira J.M.F. y Rebelo M.J.F. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolics compounds in red wines. *Biosen. Bioelectron.* 20(6): 1211-1216

[Gooding, 2004]: Gooding J.J., Wasiowych Ch., Barnett D., Hibbert B., Barisci J.N Y Wallace G.G. (2004). Electrochemical modulation of antigen-antibody binding. *Biosen. Bioelectron* 20 (2): 260-268

- [**Goyal, 2007**]: Goyal R.N., Oyama M., Umar A.A. , Tyagi A. y Bachheti N. (2007). Determination of methylprednisolone acetate in biological fluids at gold nanoparticles modified ITO electrode. *J. Pharmaceut. Biomed.* 44:1147–1153
- [**Haghighi, 2003**]: Haghighi B., Gorton L., Ruzgas T y Jonson J. (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring few phenolic compounds in flor injection analysis. *Anal. Chim Acta* 487 (1): 3-14
- [**Hart, 1997**]: Hart J.P., Pemberton R.M., Luxton R. y Wedge R. (1997). Studies towards a disposable screen-printed amperometric biosensor for progesterone. *Biosen. Bioelectron.* 12 (11): 1113-1121
- [**Hernández-Santos, 2002**]: Hernández-Santos D., González García, M.B., y Costa García A., (2002). Metal-Nanoparticles based Electroanalysis. *Electroanal.*, 14: 1225
- [**Hou, 2004**]: Hou Y., Tlili Ch., Jaffrezic-Renault N., Zhang A., Martelet C., Ponsonnet L., Errachid A., Samitier J y Bausells J. (2004). Study of mixed Langmuir-Blodgett films of immunoglobulin G/amphiphile and their application for immunosensor engineering. *Biosen. Bioelectron* 20 (6): 1126-1133
- [**Hu, 2003**]: Hu, S.Q., Xie, J.W., Xu, Q.H., Rong, K.T., Shen, L.G. y Yu R.Q. (2003). A label-free electrochemical immunosensor base on gold nanoparticles for detection of paraoxon. *Talanta* 61 (6): 769-777
- [**Huang, 2007**]: Huang, H., Ran, P. y Liu, Z., (2007). Impedance sensing of allergen–antibody interaction on glassy carbon electrode modified by gold electrodeposition. *Bioelectrochem.* 70: 257-262
- [**ISO, 1990**]: ISO 6439. Water Quality. Determination of phenol index 4-aminoantipyrone spectrometric methods after distillation
- [**Jarosz-Wilkolazka, 2004**]: Jarosz-wilkolazka A., Ruzgas T. y Gordon L. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Biosen. Bioelectron.* 35 (2-3): 238-241
- [**Jena, 2006**]: Jena B.K. y Raj C.R., (2006) Electrochemical Biosensor Based on Integrated Assembly of Dehydrogenase Enzymes and Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* 78: 6332-6339
- [**Jena, 2006**]: Jena B.K. y Raj C.R. (2006). Enzyme-Free Amperometric Sensing of Glucose by Using Gold Nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 12: 2702
- [**Jena, 2007**]: Jena B.K. y Raj C.R. (2007). Ultrasensitive Nanostructured Platform for the Electrochemical Sensing of Hydrazine. *J.Phys. Chem.C.* 111:6228.
- [**Jewell, 2001**]: Jewll W.T. y Ebeler S.E. (2001). Tyrosinase biosensor for the measurement of wine polyphenolics. *Am. J. Enol. Vitic* 52 (3): 219-222

- [Jia, 2002]: Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z. y Dong, S., 2002. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Anal. Chem.* 74(9): 2217-2223
- [Jin, 2002]: Jin B y Zhang H. (2002). Nano-gold modified glassy carbon electrode for selective determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid. *Anal. Lett.* 35 (12): 1907-1918
- [Jiang, 2003]: Jiang, L. y Gao, L. (2003). Modified carbon nanotubes: an effective way to selective attachment of gold nanoparticles. *Carbon* 41: 2923-2929
- [Katz, 2003]: Katz E y Willner I. (2003). Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors DNA-Sensor and enzyme biosensors. *Electroanal.* 15 (11): 913-947
- [Katz, 2004]: Katz E., Willner I. y Wang J. (2004). Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles *Electroanal.* 16 (1-2): 19
- [Kim, 2000]: Kim, J.H., Cho, J.H., Cha, G.S., Lee, C.W., Kim, H.B. y Paek S.H. (2000). Conductimetric membrane strip immunosensor with polyaniline-bound gold colloids as signal generator. *Biosens. Bioelectron.* 14: 907-915
- [Kim, 2003]: Kim M.A. y Lee W.Y. (2003). Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Anal. Chim Acta* 479 (2):143-150
- [Kreuzer, 2004]: Kreuzer M.P., McCarthy R., Pravda M. Y Guilbault George G. (2004). Development of electrochemical immunosensor for Progesterone Analysis in milk. *Anal. Lett.* 37 (5): 943-956
- [Kumar, 2005]: Kumar S.S, Mathiyarasu J. y Phani K.L. (2005). Exploration of synergism between a polymer matrix and gold nanoparticles for selective determination of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* 578: 95-103
- [Lei, 2003]: Lei, C-X., Gong, F.C., Shen, G.L. y Yu, R.Q. (2003). Amperometric immunosensor for Schistosoma japonicum antigen using antibodies loaded on a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode. *Sensor Actuat. B-Chem.* 96: 582-588
- [Li M., 2008]: Li M., Gao F., Yang P., Wang L. Y Fang B. (2008). Conveniently assembling dithiocarbamate and gold nanoparticles onto the gold electrode: A new type of electrochemical sensors for biomolecule detection. *Surf. Sci.* 602: 151-155
- [Li X., 2006a]: Li, X., Wu, J., Gao, N., Shen, G. y Yu, R. (2006) Electrochemical performance of l-cysteine-goldparticle nanocomposite electrode interface as applied to preparation of mediator-free enzymatic biosensors. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 117: 35-42

- [Li X, 2006b]: Li, X., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, L., Zhuo, Y. y Zhang Y. (2006). Amperometric immunosensor based on toudine blue/nano-Au through electrostatic interaction for determination of carcinoembryonic antigen. *J. Biotechnol.* 123: 356-366
- [Liang, 2005]: Liang, R., Qiu, J. y Cai, P. (2005). A novel amperometric immunosensor based on three-dimensional sol-gel network and nanoparticle self-assemble technique. *Anal. Chim. Acta* 534 (2): 223-229
- [Lin, J., 2007a]: Lin, J., Qu, W. y Zhang, S. (2007) Disposable biosensor based on enzyme immobilized on Au-chitosan-modified indium tin oxide electrode with flow injection amperometric analysis. *Anal. Biochem.* 360: 288-293
- [Lin, J., 2007b]: Lin, J., Zhang, L., y Zhang, S. (2007) Amperometric biosensor based on coentrapment of enzyme and mediator by gold nanoparticles on indium-tin oxide electrode. *Anal. Biochem.* 370: 180-185
- [Liu A., 2005]: Liu A., Honma I. Y Zhou H. (2005). Electrochemical biosensor based on protein-polisaccharide hybrid for selective detection of nanomolar dopamine metabolite of 3,4-dihydroxylacetic acid (DOPAC). *Electrochim. Comm.* 7 (2): 233-236
- [Liu S., 2002]: Liu, S.Q. y Ju, H.X. (2002). Renewable reagentless hydrogen peroxide sensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold-modified electrode. *Anal. Biochem.*, 307:110-116
- [Liu S., 2003a]: Liu, S., Yu, J. y Ju, H. (2003). Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* 540 (2): 61-67
- [Liu S., 2003b]: Liu S.Q y Ju H. (2003). Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. *Biosen. Bioelectron.* 19 (3): 177-183
- [Liu Y., 2003]: Liu Y., Yin F., Long Y., Zhang Z. y Yao S. (2003). Study of the immobilization of alcohol dehydrogenase on Au-colloid modified gold electrode by piezoelectric quartz crystal sensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 258: 75-81
- [Liu Y., 2004]: Liu, Y., Nie, L., Tao, W. y Yao, S., (2004). Amperometric Study of Au-Colloid Function on Xanthine Biosensor Based on Xanthine Oxidase Immobilized in Polypyrrole Layer. *Electroanal.* 16(15): 1271-1278
- [Liu Y., 2006]: Liu, Y., Qin, Z., Wu, X. y Jiang, H. (2006). Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode. *Biochem. Eng. J.* 32: 211-217
- [Liu, Y., 2005]: Liu Y., Wang, M., Zhao, F., Guo, Z., Chen, H. and Dong, S., (2005). Direct electron transfer and electrocatalysis of microperoxidase immobilized on nanohybrid film. *J. Electroanal. Chem.* 581: 1-10

- [Liu Y., 2007]: Liu, Y., Wu, S., Ju, H. y Xu, L., (2007). Amperometric Glucose Biosensing of Gold Nanoparticles and Carbon Nanotube Multilayer Membranes. *Electroanal.* 19(9), 986-992
- [Liu Y., 2008]: Liu, Y. (2008) Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. *Thin Solid Film* 8: 1803-1808
- [Liu Z.M., 2006]: Liu Z.M., Yang H.F., Li Y.F., Liu Y.L., Shen G.L. y Yu R.Q. (2006). Core-shell magnetic nanoparticles applied for immunosensing. *Sensor Actuators B*, 113: 956-962
- [Lu, 2002]: Lu M., Li X.H., Yu B.Z. y Li H.L. (2002). Electrochemical behavior of Au colloidal electrode through layer-by-layer self-assembly. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 248: 376-382
- [Luo, 2004]: Luo, X.L., Xu, J.J., Du, Y. y Chen, H.Y. (2004). A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Anal. Biochem.*, 334: 284-289
- [Luo, 2005]: Luo X.L., Xu J.J., Zhang Q., Yang G.J. y Chen H.Y. (2005). Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosen. Bioelectron.* 21(1): 190-196
- [Maduraiveeran, 2007]: Maduraiveeran G. y Ramaraj R. (2007). Gold nanoparticles embedded in silica sol-gel matrix as an amperometric sensor for hydrogen peroxide. *J. Electroanal. Chem.* 608: 52-58
- [Manso, 2007]: Manso, J., Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M. (2007) Electrochemical biosensors based on colloidal gold-carbon nanotubes composite electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 603: 1-7
- [Manso, 2008]: Manso, J., Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M. (2008) Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode. *Electrochim. Acta* 53: 4007-4012
- [Mello, 2003]: Mello L.D., Tabeada M.P. y Kubota L.T. (2003). HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. *Sens. Actuat. B* 96 (3): 636-645
- [Mena, 2005a]: Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M. (2005). A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Biochem.* 336: 20-27
- [Mena, 2005b]: Mena M.L., Carralero V., González-Cortés A., Yáñez-Sedeño P. y Pingarrón J.M. (2005). Laccase biosensor based on N-Succinimidyl-3-Thiopropionate-functionalized gold electrodes. *Electroanal.* 23: 2147-2155
- [Messina, 2005]: Messina G.A., Torriero A., De Vito I., Olsina R. Y Raba J. (2005). Continuous-flow/stopped-flow system using an immunobiosensor for

quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Anal. Biochem.* 337: 195-202

[**Mita, 2007**]: Mita D.G., Attanasio A., Arduini F., Diano N., Grano V., Bencivenga U., Rossi S., Amine A. y Moscone D. (2007) Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. *Biosens. Bioelectron.* 23 (1): 60-65

[**Morales, 2005a**]: Morales M.D., González M.C., Reviejo A.J. y Pingarrón J.J. (2005). Composite amperometric tyrosinase biosensors for the determination of the additive propyl gallate in a reversed micellar medium. *Sens. Actuat. B: Chemical*, 106 (2): 572-579

[**Morales, 2005b**]: Morales M.D., González M.C., Reviejo A.J. y Pingarrón J.M. (2005). A composite amperometric tyrosinase biosensor for the determination of the additive propyl gallate in foodstuffs. *Microchem. J.* 80 (1): 71-78

[**Nagy, 2007**]: Njagi, J. y Andreescu, S. (2007) Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* 23: 168-175

[**Narváez, 1996**]: narváez a., Guinea M., Ortega F. Y Domínguez E. (1996) Characterisation and optimisation of tyrosinase solid graphite electrodes for the detection of phenolic compounds. *Química analítica* 15: 83-90

[**Ohsaka, 2003**]: Raj C.R., Okajima T. Y Ohsaka T. (2003). *J. Electroanal. Chem.* 75: 2080

[**Pan, 2003**]: Pan M., Guo X., Cai Q., Li G y Chen Y. (2003). A novel glucose sensor system with Au nanoparticles based on microdialysis and coenzymes for continuous glucose monitoring. *Sens. Actuat. A* 108: 258-262

[**Pemberton, 1998**]: Pemberton R.M., Hart J.P. y Foulkes. (1998). Development of a sensitive, selective electrochemical immunoassay for progesterone in cow's milk based on a disposable screen-printed amperometric biosensor. *Electrochim. Acta* 43: 3567-3574

[**Pemberton, 1999**]: Pemberton R.M., Hart J.P., Stoddard P. y Foulkes J.A. (1999). A comparison of 1-naphthyl phosphate and 4-aminophenyl phosphate as enzyme substrates for use with a screen-printed amperometric immunosensor for progesterone in cows' milk. *Biosens. Bioelectron.* 14: 495-503

[**Pemberton, 2001**]: Pemberton R.M., Hart J.P., Mottram T.T. (2001). An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system. *Biosens. Bioelectron.* 16: 714-723

[**Peña, 2001**]: Peña N., Reviejo A.J. y Pingarrón J.M. (2001). Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta* 55: 179-187

- [Piras, 2005]: Piras, L. y Reho, S. (2005) Colloidal gold based electrochemical immunoassays for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Sensor Actuat. B-Chem.* 111-112: 450-454
- [Polsky, 2008]: Polsky, R., Harper, J.C., Wheeler, D.R., Dirk, S.M, Arango, D.C. y Brozik, S.M. (2008). Electrically addressable diazonium-functionalized antibodies for multianalyte electrochemical sensor applications. *Biosens. Bioelectron* 23 (6):757-764
- [Raj, 2003]: Raj C.R., Okajima T. Y Ohsaka T. (2003). Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* 543:127
- [Rajesh, 2004a]: Rajesh, Takashima W. y Kaneto K. (2004). Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *React. Funct. Polym.* 59 (2): 163-169
- [Rajesh, 2004b]: Rajesh W., Takashima y Kaneto K. (2004). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (N-3-aminoprpyl pyrrole- copyrrole) film. *Sens. Actuat. B* 102 (2): 271-277
- [Rajesh, 2005]: Rajesh y Kaneto K. (2005). A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl)pyrrole polymer film. *Curr. Appl. Phys.* 5 (2): 178-183
- [Rashid, 2006]: Rashid, M.H., Bhattacharjee, R.R., Kotal, A. y Mandal, T.K., (2006). Synthesis of spongy gold nanocrystals with pronounced catalytic activities. *Langmuir* 22: 7141-7143
- [Renedo, 2007]: Renedo O.D., Martínez M.J.A. (2007). Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes *Anal. Chim. Acta* 589: 255
- [Rodríguez, 2002]: Rodríguez M.C. y Rivas G.A. (2002). Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase, Analytical applications. *Anal. Chim Acta* 459: 43-51
- [Rogers, 1999]: Rogers K.R., Becker J.Y., Wnag J. y Lu F. (1999). Determination of phenols in environmentally revelant matrices with the use of liquid chromatography with an enzyme electrode detector. *Field Anal. Chem. Tech.* 3 (3): 161-169
- [Rogers, 2000]: Rogers K.R., Becker J.Y. y Cembrano J. (2000). Improved selective electrocatalytic oxidation of phenols by tyrosinase-based carbon paste electrode biosensor. *Electrochim. Acta* 45: 4373-4379
- [Sánchez, 2007]: Sánchez S., Pumera M. Y Fábregas E. (2007). Carbon nanotube/polysulfone screen-printed electrochemical immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 23 (3): 332-340

- [**Sánchez-Ordóñez, 2007**]: Sánchez Ordoñez S. y Fábregas E. (2007). New antibodies immobilization system into a graphite-polysulfone membrane for amperometric immunosensors. *Biosen. Bioelectron.* 22 (6): 965-972
- [**Sapelnikova, 2003**]: Sapelnikova S., Dock E., Ruzgas T. y Emnéus J. (2003). Amperometric sensors based on tyrosinase-modified screen-printed arrays. *Talanta* 61 (4): 473-483
- [**Serra, 2002**]: Serra B., Jiménez S., Mena M.L., Reviejo A.J. y Pingarrón J.M. (2002). Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors. *Biosen. Bioelectron.* 17: 217-226
- [**Serra, 2003**]: Serra B., Reviejo A.J. y Pingarrón J.M. (2003). Composite multienzyme amperometric biosensors for an improved detection of phenolic compounds. *Electroanal.* 15 (22): 1737-1744
- [**Shipway, 2000**]: Shipway A.N., Hatz E. y Willner I. (2000). Nanoparticles arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *Chemphysche* 1: 18-52
- [**Shulga, 2007**]: Shulga, O. y Kirchhoff, J.R. (2007). An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. *Electrochem. Comm.* 9: 935-940
- [**Soares-Rosatto, 2001**]: Soares-Rosatto S., Sanches-Freire R., Durán N., Tsatsuo-Kubota L. (2001). Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova* 24: 77-86
- [**Solná, 2005a**]: Solná R., Sapelnikova S., Skládal P., Winther Nielsen M., Carlsson C., Emnéus J. y Ruzgas T. (2005). Multienzyme electrochemical array sensor for determination of phenols and pesticides. *Talanta* 65: 349-357
- [**Solná, 2005b**]: Solná R., Dock E., Christenson A., Winther-Nielsen M., Carlsson C., Emnéus J., Ruzgas T. y Skládal P. (2005). Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases. *Anal. Chim. Acta* 528 (1): 9-19
- [**Song, 2006**]: Song Y.S. Muthuraman Y.Z. Chen C.C., Lin J.M. (2006). Screen Printed Carbon Electrode Modified with Poly(L-Lactide) Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive As(III) Detection. *Electroanal.* 18:1763
- [**Stanca, 2003**]: Stanca S.E., Popescu I.C. y Oniciu L. (2003). Biosensors for phenol derivatives using biochemical signal amplification. *Talanta* 61 (4): 501-507
- [**Streffer, 2001**]: Streffer K., Vijgenboom E., Tepper A.W.J.W., Makower A., Sheller F.W., canters G.W. y Wollenberger U. (2001). Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal Chim. Acta* 427: 201-210

- [Sulak, 2006]: Sulak, M.T., Gökdoğan, Ö., Gülce, A. y Gülce, H., (2006). Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1719-1726
- [Sun, 2007]: Sun, Y. Bai, Y., Yang, W. y Sun C. (2007) Controlled multilayer films of sulfonate-capped gold nanoparticles/thionine used for construction of a reagentless bienzymatic glucose biosensor, *Electrochim. Acta* 52: 7352-7361
- [Tang, 2004a]: Tang, D., Yua, R., Chai, Y., Zhong, X., Liu Y. y Dai, J. (2004). Novel potentiometric immunosensor for the detection of diphtheria antigen based on colloidal gold and polyvinyl butyral as matrixes. *Biochem. Eng. J.* 22: 43-49
- [Tang, 2004b]: Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Da,i J., Zhong, X. y Liu Y. (2004). A novel immunosensor based on immobilization of hepatitis B surface antibody on platinum electrode modified colloidal gold and polyvinyl butyral as matrices via electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochem.* 65: 15-22
- [Tang, 2004c]: Tang, D.P., Yuan, R., Chai, Y.Q., Zhong, X., Liu, Y., Dai, J. y Zhang L.Y. (2004). Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Anal. Biochem.* 333 (2), 345-350
- [Tang y Ren, 2005]: Tang, D. y Ren, J.J., (2005). Direct and rapid detection of diphtherotoxin via potentiometric immunosensor based on nanoparticles mixture and polyvinyl butyral as matrixes. *Electroanal.* 17(24): 2208-2216
- [Tang, 2005a]: Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, L. Zhong, X., Liu, Y. y Dai, J. (2005). Preparation and application on a kind of immobilization method of anti-diphtheria for potentiometric immunosensor modified colloidal Au and polyvinyl butyral as matrixes. *Sensor Actuat. B-Chem* 104: 199-206
- [Tang, 2005b]: Tang, D., Yuan, T.R., Chai, Y., Fu, Y., Dai, J., Liu, Y. y Zhong X. (2005). New amperometric and potenciométrica immunosensors based on gold nanoparticles/tris(2,2-bipyridyl)cobalt(III) multilayer films for hepatitis B surface antigen determinations. *Biosens. Bioelectron.* 21 (4): 539-548
- [Tang, 2005c]: Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, L., Zhong, X., Liu, Y. y Dai, J. (2005). Preparation and application on a kind of immobilization method of anti-diphtheria for potentiometric immunosensor modified colloidal Au and polyvinyl butyral as matrixes. *Sensor Actuat. B-Chem* 104:199-206
- [Tang, 2005d]: Tang, D, Yuan, R., and Chai Y. (2005). Amplification of antigen-antibody interactions via back-filling immobilization of GOx on antibody-functionalized core shell SiO<sub>2</sub>/Au nanoparticle surfaces. *Biosens. Bioelectron.* (En prensa)
- [Tang, 2006a]: Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Zhong, X., Liu, Y. y Dai, J. (2006) Electrochemical detection of hepatitis B surface antigen using colloidal gold nanoparticles modified by a sol-gel network interface. *Clin. Biochem.* 39: 309-314

- [**Tang, 2006b**]: Tang, D., Yuan, R. y Chai, Y. (2006). Electrochemical immuno-bioanalysis for carcinoma antigen 125 based on thionine and gold nanoparticles-modified carbon paste interface. *Anal. Chim. Acta* 654: 158-165
- [**Tang, 2006c**]: Tang, D., Zhang, D.J., Tang, D.Y y Ai, H. (2006). Amplification of the antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface. *J. Immunol Methods* 316: 144-152
- [**Tang, 2007**]: Tang, D., Yuan, R. y Chai, Y. (2007). Biochemical and immunochemical characterization of the antigen-antibody reaction on a non-toxic biomimetic interface immobilized red blood cells of crucian carp and gold nanoparticles. *Biosen. Bioelectron.* 22: 1116-1120
- [**Tangkuaram, 2007**]: Tangkuaram, T., Ponchio, C., Kangkasomboon, T., Katikawong, P. y Veerasai, W. (2007). Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan. *Biosens. Bioelectron.* 22: 2071-2078
- [**Tembe, 2006**]: Tembe S., Karve M., Inamdar S., Haram S., Melo J. y D'Souza S. F., (2006). Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biocopolymeric film. *Anal. Biochem.* 349 (1): 72-77
- [**Tembe, 2007**]: Tembe s., Inamdar S., Haram S., Karve M. y D'Souza S.F. (2007). Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase. *J. Biotechnol.* 128 (1): 80-85
- [**Tingry, 2006**]: Tingry S., Innocent C., Touil S., Deratani A. y Seta P. (2006). Carbon paste biosensor for phenol detection of impregnated tissue: modification of selectivity by using  $\beta$ -cyclodextrin-containing PVA membrane. *Mat. Sci. Eng. C-Bio S.* 26 (2-3): 222-226
- [**Torriero, 2006**]: Torriero A.A.J., Salinas E., Marchevsky E.J., Raba J y Sulber J.J. Penicillamine determination using a tyrosinase micro-rotating biosensor. (2006). *Anal. Chim. Acta*, 580 (2): 136-142
- [**Tsai, 2007**]: Tsai Y.C. y Chiu C.C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sens. Actuat. B. Chemical*, 125 (1): 10-16
- [**Valat, 2000**]: Valat C., Limoges B., Huet D y Romette J-L. (2000). "A disposable Protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection" *Anal. Chim. Acta* 404 (2): 187-194
- [**Védrine, 2003**]: Védrine C., Fabiano S. y Tran-Minh C. (2003): Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta* 59 (3): 535-544

- [Velasco-García, 2001]: Velasco-García Maria N. y mottram T. (2001). Biosensors in the livestock industry: an automated ovulation prediction system for dairy cows. *Trends in Biotechnology* 19 (11):433
- [Wang B., 2000]: Wang B., Zhang J., Dong S. (2000). Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 15 (7-9): 397-402
- [Wang J., 1994]: Wang J., Lu F. y Lopez D. (1994). Tyrosinase-based ruthenium dispersed carbon paste biosensor for phenols. *Biosens. Bioelectron.* 9: 9-15
- [Wang L., 2004]: Wang L. y Wang E. (2004). A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode. *Electrochem. Commun.*, 6 (2): 225-229
- [Wang L., 2006]: Wang L., Bai J., Huang P., Wang H., Zhang L., Zhao Y., (2006). Nanostructured gold colloid electrode based on in situ functionalized self-assembled monolayers on gold electrode. *Electrochem. Commun.*, 8: 1825-1829
- [Wang M., 2004]: Wang, M., Wang, L., Wang, G., Ji, X., Bai, Y., Li, T., Gong, S. y Li, J. (2004). Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions. *Biosens. Bioelectron.* 19 (6): 575-582
- [Wang P., 2007]: Wang P., Li Y., Huang X., Wang L. (2007). Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid. *Talanta* 73: 431-437
- [Wang Z., 2006]: Wang Z., Yang Y., Li J., Gong J., Shen G y Yu R. (2006). Organic-inorganic matrix for electrochemical immunoassay: Detection of human IgG based on ZnO/chitosan composite. *Talanta* 69 (3):686-690
- [Wilson M.S., 2004]: Wilson M.S y Rauh R.D. (2004). "Novel amperometric immunosensors based on iridium oxide matrices" *Biosens. Bioelectron.* 19 (7): 693-699
- [Wu B.Y., 2007]: Wu, B.Y., Hou, S.H., Yin, F., Li, J. y Zhao, Z.X., (2007). Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosens. Bioelectron.* 22: 838-844
- [Wu L., 2006]: Wu, L., Chen, J., Du, D. y Ju, H. (2006). Electrochemical immunoassay for CA125 based on cellulose acetate stabilized antigen/colloidal gold nanoparticles membrane. *Electrochim. Acta* 51 (7): 1208-1214
- [Wu Z.S., 2005]: Wu, Z.S., Li, J. S., Luo, M.H., Shen, G. L. y Yu, R.Q. (2005). A novel capacitive immunosensor based on gold colloid monolayers associated with a sol-gel matrix. *Anal. Chim. Acta* 528: 235-242

- [Xian, 2006]: Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H. y Jin, L., (2006). Glucose biosensor based on Au-conductive polyaniline nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1996-2000
- [Xiao, 1999]: Xiao Y., Ju H.X. y Chen H.Y. (1999). Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Anal. Chim. Acta* 391: 73-82
- [Xiao, 2008]: Xiao F., Ruan C., Li J., Liu L., Zhao F. y Zeng B. (2008). Voltammetric Determination of Xanthine with a Single-Walled Carbon Nanotube-Ionic Liquid Paste Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanal.* 20 (4): 361-366
- [Xu Q., 2006]: Xu Q., Mao, C., Liu, N.N., Zhu, J.J. y Sheng, J., (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* 22: 768-773
- [Xu S., 2006]: Xu S., Tu, G., Peng, B. y Han, X., (2006). Self assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres for fabrication of a mediatorless biosensor. *Anal. Chim. Acta* 570: 151-157
- [Xu S., 2007]: Xu S., Peng, B. y Han, X., (2007). A third-generation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on horseradish peroxidase-labeled Au nanoparticles self-assembled to hollow porous polymeric nanospheres. *Biosens. Bioelectron.* 22: 1807-1810
- [Xu Y., 2006]: Xu Y.Y., Bian, C., Chen, S. y Xia, S. (2006). A microelectronic technology based amperometric immunosensor for  $\alpha$ -fetoprotein using mixed self-assembled monolayers and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* 561 (1-2): 48-54
- [Xu Y.F., 2005]: Xu Y.F., Velasco-García M., Mottram T.T. (2005). Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2061-2070
- [Xue, 2006]: Xue, M.H., Xu, Q., Zhou, M. y Zhu, J.J. (2006) In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection. *Electrochem. Comm.* 8: 1468-1474
- [Yang, 2006a]: Yang, W., Wang, J., Zhao, S., Sun, Y. y Sun, C., (2006). Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Electrochem. Commun.* 8: 665-672
- [Yáñez-Sedeño, 2005]: Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M., (2005). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 884-886
- [Yi, 2000]: Yi X., Huang-Xian J. y Hong-Yuan C. (2000). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode. *Anal. Biochem.* 278: 22-28

- [Yu A.M., 2003]: Yu A.M., Liang Z.J., Cho J.H. y Caruso R. (2003). *Nano Lett.* **3**: 1203
- [Yu, 2003]: Yu J., Liu S., y Ju H. (2003). Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosens. Bioelectron.* **19** (5): 509-514
- [Yuan, 2005]: Yuan, R., Zhang, L., Li, Q., Chai, Y. y Cao. S. (2005). A label-free amperometric immunosensor based on multi-layer assembly of polymerized *o*-phenylenediamine and gold nanoparticles for determination of Japanese B encephalitis vaccine. *Anal. Chim. Acta* **531** (1): 1-5
- [Yun, 2007]: Yun Y, Bange A., Heineman W.R., Halsall H. Brian, Shanov V. N., Dong Z., Pixley S., Behbehani M., Jazieh A., Tu Yi et al. (2007). A nanotube array immunosensor for direct electrochemical detection of antigen-antibody binding. *Sensor Actuat B: Chem.* **123** (1): 177-182
- [Zacco E., 2004]: Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., M del Valle y Alegret S. (2004). "Renewable Protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing" *J. Immunological Methods* **286** (1-2): 35-46
- [Zare, 2006]: Zare H.R., Nasirizadeh N., Golabi S.M., Namazian M., Mazloun-Ardakani M. Y Nematollahi D. (2006). Electrochemical evaluation of coumestan modified carbon paste electrode: Study on its application as a NADH biosensor in presence of uric acid. *Sens. Actuat B* **114**: 610-617
- [Zhang F.H., 2006]: Zhang, F.H., Cho, S.S., Yang, S.H., Cho, S.S., Yang, S.H., Seo, S.S., Cha, G.S. y Nam, H., (2006). Gold nanoparticle-based mediatorless biosensor prepared on microporous electrode. *Electroanal.* **18**(3): 217-222
- [Zhang S., 2005]: Zhang, S., Wang, N., Yu, H., Niu, Y. y Sun, C. (2005). Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. *Bioelectrochem.* **67**: 15-22
- [Zhang S., 2006]: Zhang, S., Yang, W., Niu, Y., Li, Y., Zhang, M. y Sun, C., (2006). Construction of glucose biosensor based on sorption of glucose oxidase onto multilayers of polyelectrolyte/nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**: 736-741
- [Zhang T., 2003]: Zhang T., Tian B., Kong J., Yang P. y Liu B. (2003). A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic-organic hybrid titania sol-gel matrix. *Anal. Chim. Acta* **489** (2): 199-206
- [Zhao, 2006]: Zhao, S., Zhang, K., Bai, Yu, Yang, W. y Sun C. (2006). Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis. *Bioelectrochem.* **69**: 158-163
- [Zhong, 2005]: Zhong, X., Yuan, R., Chai, Y., Liu, Y., Dai, J. y Tang, D., (2005). Glucose biosensor based on self-assembled gold nanoparticles and double-layer

2d-network (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer onto gold substrate  
*Sens. Actuat B* 104: 191-198

[**Zhou, 2006**]: Zhou Y. y Zhi J. (2006). Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode. *Electrochem. Comm.* 8 (12): 1811-1816

[**Zhu, 2006**]: Zhu, Q., Yuan, R., Chai, Y., Zhuo, Y., Zhang, Y., Li, X. y Wang, N., 2006. A Novel Amperometric Biosensor for Determination of Hydrogen Peroxide Based on Nafion and Polythionine as Well as Gold Nanoparticles and Gelatin as Matrixes. *Anal. Lett.* 39, 483-494

[**Zhu M., 2002**]: Zhu M, Liu M, Shi G., Xu F., Ye X., Chen J., Jin L. y Jin J (2002). Novel nitric oxide microsensor and its application to the study of smooth muscle cells. *Anal. Chim. Acta* 455: 199-206

[**Zhuo, 2005a**]: Zhuo, Y., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, Y., Wang, N., Li, X., Zhu, Q. y Wang, N. (2005). An amperometric immunosensor based on immobilization of hepatitis B surface antibody on gold electrode modified gold nanoparticles and horseradish peroxidase. *Anal. Chim. Acta* 548 (1-2): 205-210

[**Zhuo, 2005b**]: Zhuo, Y., Yuan, R., Chai, Y., Tang, D., Zhang, Y., Wang, N., Li, W. y Zhu, Q. (2005). A reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/thionine/Nafion-membrane-modified gold electrode for determination of  $\alpha$ -fetoprotein. *Electrochem. Commun.* 7: 355-360

[**Zhuo, 2006**]: Zhuo, Y., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, Y., Li, X., Wang, N. y Zhu, O. (2006). Amperometric enzyme immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and thionine on Nafion modified electrode surface for  $\alpha$ -1-fetoprotein determinations. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 114 (2): 631-639

[**Zhuping, 2000**]: Zhuping W., Zhang C., Yang C., Zhang X., Wu E. (2000). Simultaneous quantitative determination of norgestrel and progesterone in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analyst.* 125 (2): 2201-2205.

---

***GLOSARIO DE  
ABREVIATURAS***

---

- **4-AMPh**: 4- Aminotiofenol
- **Ab**: Anticuerpo
- **AChE**: Acetilcolinesterasa
- **ACN**: Acetonitrilo
- **ADH**: Alcohol deshidrogenasa
- **AET**: Mercaptoetilamina
- **AFB<sub>1</sub>**: Aflatoxina B<sub>1</sub>
- **AFP**:  $\alpha$ -1-Fetoproteína
- **Ag**: Antígeno
- **Anti-AFP**: Anti-fetoproteína
- **Anti-CEA**: Anticuerpo carcinoembriónico
- **Anti-hCG**: anti- human chorionic gonadotrophin
- **AP**: Fosfatasa alcalina
- **APTS**: 3-Aminopropiltriétoxissilano
- **ASV**: Voltamperometría de stripping anódico
- **Au<sub>col</sub>**: Oro coloidal
- **B**: Boro
- **BSA**: Suero de albúmina bovino
- **CA125**: Carcinoma antígeno-125
- **CA15-3**: Marcador tumoral del cáncer mamario
- **C<sub>d</sub>**: Capacidad de la doble capa
- **CE**: Comunidad Europea
- **CEA**: Antígeno carcinoembriónico
- **Cit C**: Citocromo C
- **CNT**: Nanotubo de carbono
- **CPE**: Elemento de fase constante
- **CV**: Voltamperometría cíclica

- **DA:** Ácido domoico
- **DHB:** Dihidroxibenceno
- **DMG:** Dimetilformamida
- **DMP:** Dimetilfenol
- **DOPAC:** 3,4-Dihidroxifenilacético
- **DPV:** Voltamperometría diferencial de impulsos
- **DTSP:** 3-3'-Ditio-bis (ácido propionico N-hidroxisuccinimida ester)
- **EDC:** 1-Etil-3-(dimetilaminopropil) carbodimida
- **EIS:** Espectroscopia de impedancia electroquímica
- **EPA:** Agencia de Protección Ambiental Norteamericana
- **EPD:** Etilenpropilendieno
- **GA:** Glutaraldehído
- **GCE:** Electrodo de carbono vitrificado
- **GCPE:** Electrodo pasta de carbono vitrificado
- **GDH:** Glucosa deshidrogenasa
- **GOx:** Glucosa oxidasa
- **GT:** Grafito-Teflón
- **H.py-IgG:** Helicobacter Pylori
- **HbsAg:** Antígeno de la hepatitis B
- **HDT:** 1,6- Hexanoditiol
- **HRP:** Peroxidasa de rábano
- **Hx:** Hipoxantina
- **IgG:** Inmunoglobulina G
- **ITO:** Óxido de titanio e indio
- **K°:** Constante de transferencia electrónica
- **LBL:** Layer-by-layer
- **LD:** Límite de detección
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

- **lg pfu ml<sup>-1</sup>**: Logaritmo de unidades formadoras de placas. (plaque forming unit)
- **LSV**: Voltamperometría de barrido lineal
- **mAb**: Inmunoglobulina G de ratón
- **MP-11**: Microperoxidasa
- **MPTS**: Mercaptopropiltriétoxissilano.
- **n-Au**: Nanopartículas de oro
- **Nf**: Nafion
- **NHS**: N-Hidroxi-sulfoxinimida
- **ODT**: 1- Octanodecanotiol
- **PANAM**: Poliamidoamina
- **PBS**: Disolución reguladora fosfato
- **PEDOT**. 3,4-Etilenditioxitiofeno
- **PLY**: Pneumolisina
- **PSA**: Antígeno específico de la prostata
- **pSf**: Polisulfona
- **PVB**: Polivinilbutiral
- **PVS**: Ácido polivinilsulfónico
- **QMC**: Microbalanza cristal de cuarzo
- **RBC**: Red blood cells of crucian carp
- **R<sub>c</sub>**: Resistencia a la transferencia de carga
- **rIgG**: Inmunoglobulina G de conejo
- **R<sub>s</sub>**: Resistencia de la disolución
- **RVC**: Carbono vítreo reticulado
- **SAMs**: Monocapas autoensambladas
- **Screen-Printed**: Electrodo serigrafiado
- **SEM**: Microscopia electrónica de barrido
- **SH**: Salicilato hidroxilasa

- **SjAb**: Anticuerpo de Schistosoma japonicum
- **SPE**: Electrodo de screen printed
- **SWV**: Voltamperometría de onda cuadrada
- **TAC**: Triacetato de celulosa
- **TB**: Azul de Toluidina
- **Thi**: Tionina
- **Tir**: Tirosinasa
- **TMB**: Tetraetilfulvaleno
- **XOD**: Xantina oxidasa
- **Zw**: Impedancia de Warburg

