

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Estrategias de modificación de electrodos para la preparación de superficies biosensoras

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marcos Eguílaz Rubio

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón
Paloma Yáñez Sedeño Orive
Lourdes Agüí Chicharro

Madrid, 2013

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica



**ESTRATEGIAS DE MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS
PARA LA PREPARACIÓN DE SUPERFICIES
BIOSENSORAS**

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

Dra. Paloma Yáñez Sedeño Orive

Dra. Lourdes Agüí Chicharro

TESIS DOCTORAL

MARCOS EGUÍLAZ RUBIO

MADRID, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria
28040 - Madrid
Teléfono – 91.394.43.31
Fax – 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DÑA. MARÍA ANTONIA PALACIOS CORVILLO, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACER CONSTAR:

Que el trabajo titulado: **“Estrategias de modificación de electrodos para la preparación de superficies biosensoras”** ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón, Paloma Yáñez-Sedeño Orive y Lourdes Agüí Chicharro**, Profesores de dicho Departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 21 de Diciembre de 2011

Fdo. María Antonia Palacios Corvillo

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Paloma Yáñez-Sedeño Orive

Fdo. Lourdes Agüí Chicharro

Fdo. Marcos Eguílaz Rubio

A mi familia. A K.

"El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo."

F.Nietzsche

En este momento en el que todo está a punto de terminar, quisiera dar las gracias a los que han estado conmigo durante todo este tiempo.

Para comenzar, quisiera agradecer a mi familia. A mis padres, porque sin vuestro apoyo y esfuerzo a lo largo de mi vida nunca habría llegado a este punto en el que me encuentro. Mamá, tú nos has antepuesto a todo para sacarnos adelante y lo has hecho verdaderamente excelente. Papá, tú eres otro nivel de persona y menos mal que se confundieron en la sala de neonatología, porque estoy agradecido de haberte conocido y haber tenido la posibilidad de nutrirme de tus valores. Te quiero mucho viejo rebelde. A mi hermano Joaquín, un espejo en el que mirarme, y a mi cuñada Vanessa, humilde y luchadora como pocas. También a mis tíos y primos, en especial a Josito e Ismael, que siempre cuidaron de mí. Sin duda la mejor educación que he recibido os corresponde a todos vosotros. Os quiero.

A “petardis milu”, que aunque te saco del párrafo familiar, considero que estas dentro. Apareciste en el momento más crítico para permitirme salir a cielo abierto sin temor. Sin ti esta Tesis tampoco habría sido posible. Te quiero mucho. Lo siento y muchas gracias.

A los directores de Tesis: el Dr. José Manuel Pingarrón, la Dra. Paloma Yáñez y la Dra. Lourdes Agüí, por ofrecirme la oportunidad de trabajar y aprender en este grupo y por su interés, ayuda y dedicación durante todos estos años.

A la Dra. Araceli González, por saltar de su silla dispuesta a pelearse con la ciencia y estar ahí cuando necesitaba algo.

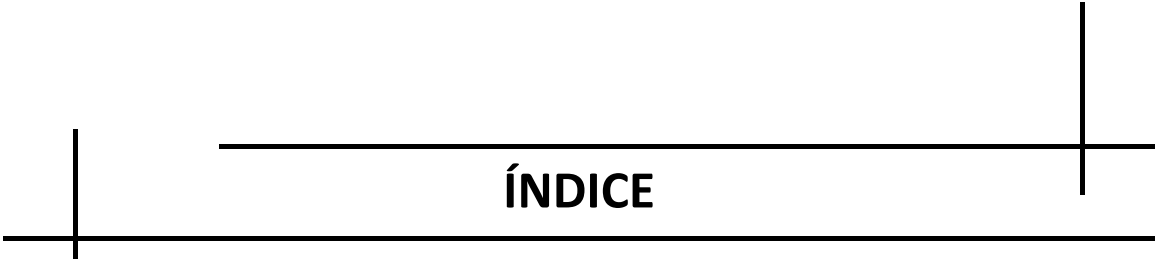
A la Dra. Susana Campuzano por su desinteresada ayuda en momentos complicados de esta Tesis, su dedicación y estar siempre dispuesta a echar una mano.

De forma muy especial al Dr. Reynaldo Villalonga, por compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme en todos los aspectos. Inolvidables conversaciones en el coche de vuelta a casa: “... no te metas en mandangas argentino”. Eres un gurú. Gracias Amigo.

También a los profesores del grupo, la Dra. María Pedrero y el Dr. Julio Reviejo, por su permanente disposición durante todo este tiempo.

Después de tanto tiempo pasado en el laboratorio, han sido muchos los compañeros que he tenido y que en algún momento dado me han ayudado en este camino. Gracias a todos, en especial a María Gamella, Vanessa Escamilla y Verónica Carralero por su apoyo y ayuda cuando comenzaba a sumergirme en este mundo de los biosensores. No puedo olvidarme de la Dra. Mari Luz Mena, el punto de inicio de todo el camino recorrido para el desarrollo de esta Tesis. Muchas gracias.

Y por último, agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador y a la financiación del Proyecto CTQ2006-02743.



	<u>Índice</u>
	<u>Página</u>
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	1
I.- INTRODUCCIÓN	5
1. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	7
1.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS	10
1.2. INMUNOSENSORES	12
1.3. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN	17
1.4. MAGNETOINMUNOSENSORES	19
2. SUPERFICIES ELECTRÓDICAS NANOESTRUCTURADAS	25
2.1. NANOTUBOS DE CARBONO	26
2.2. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO	30
2.3. MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO	33
2.3.1. POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS	33
2.3.2. PDDA Y NANOPARTÍCULAS	43
3. BIBLIOGRAFÍA	59

**II.- DESARROLLO DE BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS
BASADOS EN EL EMPLEO DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE
NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(3-METILTIOFENO) 69**

1. BIOSENSOR DE CITOCROMO C BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(3-METILTIOFENO)	73
1.1. PARTE EXPERIMENTAL	85
1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	85
1.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR	86
1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(3-METILTIOFENO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (P3MT/MWCNTs/GCE)	86
1.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE CITOCROMO C	88
1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	89
1.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	90
1.1.3.2. VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS	91
1.1.3.3. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS	91
1.1.4. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	91
1.1.5. DETERMINACIÓN DE NITRITO	92
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
1.2.1. INMOVILIZACIÓN Y TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DIRECTA DE CITOCROMO C SOBRE P3MT/MWCNTs	94
1.2.2. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	98
1.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES ...	98

1.2.2.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE H ₂ O ₂	106
1.2.2.3. ESTABILIDAD	108
1.2.2.4. INTERFERENCIAS	110
1.2.3. DETERMINACIÓN DE NITRITO.....	111
2. BIOSENSOR DE LACTATO DESHIDROGENASA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(3-METILTIOFENO)	115
2.1. PARTE EXPERIMENTAL	127
2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	127
2.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR	128
2.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(3-METILTIOFENO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (MWCNT _s /P3MT/GCE)	128
2.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENSA	129
2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	130
2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	130
2.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS	131
2.1.4. DETERMINACIÓN DE LACTATO EN VINO	131
2.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA	131
2.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS	131
2.1.4.3. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	132
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
2.2.1. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR LDH/MWCNT _s /P3MT/GCE.....	134
2.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	136

2.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE LACTATO.....	141
2.2.1.3. ESTABILIDAD	142
2.2.1.4. INTERFERENCIAS	143
2.2.2. DETERMINACIÓN DE LACTATO EN MUESTRAS DE VINO.....	144
3. CONCLUSIONES	147
4. BIBLIOGRAFÍA	149

III.- DESARROLLO DE BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN SUERO HUMANO **153**

1. BIOSENSOR DE COLESTEROL BASADO EN UN ELECTRODO HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(DIALILDIMETILAMONIO) CON NANOPARTÍCULAS DE ORO	159
1.1. PARTE EXPERIMENTAL	171
1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	171
1.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR	173
1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (PDDA/CNTs)	173
1.1.2.2. PREPARACIÓN DE ORO COLOIDAL	174
1.1.2.3. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE)	174

1.1.2.4. INMOVILIZACIÓN DE COLESTEROL OXIDASA Y COINMOVILIZACIÓN DE ChOx/HRP	175
1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	176
1.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	177
1.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS	177
1.1.3.3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA...	178
1.1.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO	178
1.1.4.1. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS	178
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	180
1.2.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO PDDA/MWCNTs	182
1.2.2. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE..	184
1.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	186
1.2.2.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE H ₂ O ₂	192
1.2.3. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/ GCE	193
1.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	195
1.2.4. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE	200
1.2.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	201
1.2.5. CALIBRADOS Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL	204
1.2.6. ESTABILIDAD	207
1.2.7. INTERFERENCIAS	209
1.2.8. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO	211

2. BIOSENSOR BIENZIMÁTICO DE COLESTEROL BASADO EN UN ELECTRODO HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(DIALILDIMETILAMONIO) CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	213
2.1. PARTE EXPERIMENTAL	225
2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	225
2.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR	227
2.1.2.1. FABRICACIÓN DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS CON GLUTARALDEHIDO (GA-MNPs/PDDA/MWCNTs).....	227
2.1.2.2. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS CON GLUTARALDEHIDO (GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE).....	229
2.1.2.3. COINMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS COLESTEROL OXIDASA Y PEROXIDASA DE RÁBANO	230
2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	231
2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	231
2.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS	231
2.1.3.3. ESPECTROSCOPÍA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA...	232
2.1.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO	232
2.1.4.1. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS.....	232
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	233
2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS GA-MNPs	233

2.2.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO GA-MNPs/ PDDA/MWCNTs	239
2.2.3. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR ChOx/HRP-GA-MNPs/ PDDA/MWCNTs	243
2.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES ...	243
2.2.3.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL	248
2.2.3.3. ESTABILIDAD.....	250
2.2.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO	253
3. CONCLUSIONES	255
4. BIBLIOGRAFÍA	257

IV.- DESARROLLO DE INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN SUERO HUMANO

261

1. INMUNOSENSOR DE TESTOSTERONA BASADO EN UN ELECTRODO COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO	265
1.1. PARTE EXPERIMENTAL	279
1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	279
1.1.2. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR	281
1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO, NANOPARTÍCULAS DE ORO Y TEFLÓN (AuNPs/MWCNTs/teflón)	281
1.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE ANTI-TESTOSTERONA	282

1.1.2.3. PROCEDIMIENTO DE INMUNOENSAYO	282
1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	283
1.1.3.1. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS	284
1.1.4. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO	284
1.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESRTRA	284
1.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS	285
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	286
1.2.1. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR	286
1.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	286
1.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA	297
1.2.1.3. ESTABILIDAD	298
1.2.1.4. INTERFERENCIAS	300
1.2.2. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO	301
2. INMUNOSENSOR DE TESTOSTERONA BASADO EN MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO	303
2.1. PARTE EXPERIMENTAL	313
2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	313
2.1.2. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR	315
2.1.2.1. INMOVILIZACIÓN DE ANTI-TESTOSTERONA	315
2.1.2.2. PROCEDIMIENTO DE INMUNOENSAYO	315
2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	316
2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	317

2.1.3.2. AMPEROMETRÍA	317
2.1.4. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO	318
2.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA	318
2.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS	318
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	320
2.2.1. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR	322
2.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	322
2.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA	328
2.2.1.3. ESTABILIDAD	331
2.2.1.4. INTERFERENCIAS	333
2.2.2. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO	335
3. CONCLUSIONES	337
4. BIBLIOGRAFÍA	339
V.- CONCLUSIONES GENERALES	341
<hr style="border: 1px solid black;"/>	
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	345
<hr style="border: 1px solid black;"/>	

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El OBJETIVO principal de esta Tesis Doctoral ha sido el **desarrollo de biosensores basados en superficies electrónicas modificadas con materiales de última generación y su aplicación a la determinación de especies de interés.**

Con el fin de lograr la construcción de plataformas sensoras sensibles y selectivas, se ha hecho uso de diversas estrategias de modificación empleando nanomateriales: nanotubos de carbono y nanopartículas de oro o magnéticas de magnetita, así como polímeros conductores electrónicos, polielectrólitos y micropartículas magnéticas. El tipo de transducción a que dan lugar las superficies electrónicas modificadas con nanomateriales es el más perfecto y avanzado encontrado hasta el momento para la detección electroquímica de algunas especies de interés biológico. En él se complementan parámetros analíticos de gran importancia, como la rapidez de respuesta y la sensibilidad, así como la robustez innata a ciertos diseños, como los basados en materiales compósitos, que hacen posible su utilización inmediata en el análisis de muestras reales. Por otro lado, las especies a las que se han aplicado las configuraciones descritas en este trabajo se han escogido cuidadosamente, y constituyen moléculas clave en distintas áreas del bioanálisis, tanto alimentario como clínico, proponiéndose en esta Tesis Doctoral distintos métodos de detección sencillos y fiables.

Considerándolas de un modo general, las investigaciones que se describen a lo largo de esta Memoria se refieren a la construcción de dos tipos de biosensores: enzimáticos y de afinidad (inmunosensores). Concretamente, se han desarrollado las siguientes configuraciones:

- Biosensores amperométricos basados en el empleo de un material híbrido de nanotubos de carbono y poli(3-metiltiofeno) para la determinación de nitrito y de ácido láctico en muestras de vino.
- Biosensores amperométricos para la determinación de colesterol en suero humano basados en el empleo de materiales híbridos de nanotubos de carbono, poli(dialildimetilamonio) y nanopartículas de oro o magnéticas de magnetita.

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de testosterona en suero humano basados en el empleo de un material compósito de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y teflón, así como en el empleo de micropartículas magnéticas.

Aunque las sistemáticas de preparación y optimización de estos bioelectrodos son algo diferentes entre sí, sin embargo existen aspectos comunes, habituales en la investigación electroanalítica, que han dirigido el PLAN DE TRABAJO a lo largo de los experimentos. Estos aspectos pueden resumirse en las siguientes etapas:

- Optimización de todas las variables implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor.
- Caracterización de la superficie electródica modificada empleando distintas técnicas y métodos.
- Obtención de los calibrados y sus características analíticas, incluyendo diversos parámetros de estabilidad y selectividad. Estas características se han comparado en todos los casos, y con resultados ventajosos, con las existentes en la bibliografía.
- Aplicación a la determinación de analitos en muestras reales.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que se presentan actualmente en los sectores industrial, clínico, agroalimentario, medioambiental y forense, requiere el uso de técnicas sensibles, sencillas de usar, de bajo coste, rápidas, fiables y portátiles que permitan la detección “in situ” de las especies de interés y, por tanto, que hagan posible la adopción con rapidez de las medidas necesarias para la resolución de problemas. Esta necesidad ha intensificado en los últimos años el desarrollo de los sensores químicos en general y de los biosensores en particular.

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor (*Figura 1*).

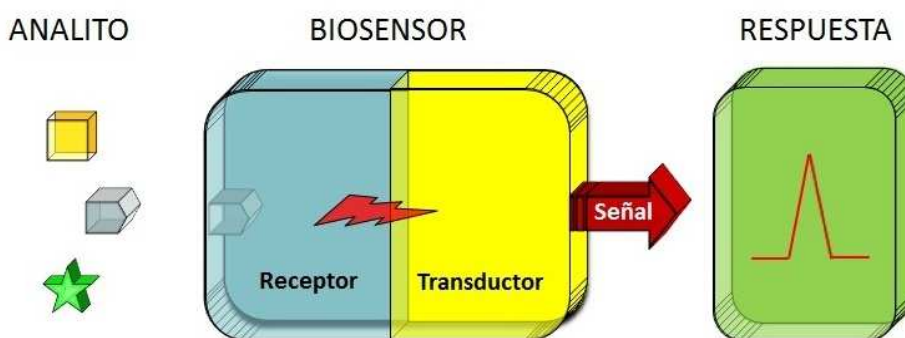


Figura 1. Esquema generalizado de un biosensor.

Tal como se observa en la *Figura 1*, el sistema de reconocimiento biológico debe inmovilizarse o retenerse sobre la superficie del transductor. En estas condiciones, la ventaja de la alta selectividad de estos sistemas se combina con la transducción directa a una señal fácilmente medible, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible en la interfase transductor – receptor.

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. De este modo, la naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares capaces de reconocer con una gran selectividad alguna propiedad particular de una determinada especie entre un conjunto de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de moléculas puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y preparación de sensores de dichas especies. El transductor debe permitir la conversión de la reacción bioquímica que se produce entre el analito y el elemento de reconocimiento biológico en una respuesta que posteriormente es amplificada, procesada y convertida a la forma deseada, y que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesamiento de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la interacción del analito con el componente biológico. Idealmente, un biosensor debe responder continua y reversiblemente al analito de interés sin alterar la muestra, eliminando de este modo la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recogida [Pingarrón, 1999].

Desde el punto de vista del *fundamento del transductor*, los biosensores pueden clasificarse en *electroquímicos*, que a su vez se dividen en potenciométricos o amperométricos; biosensores *ópticos*, que pueden ser espectroscópicos de absorción, fluorimétricos o fosforimétricos, entre otros; biosensores *térmicos* y biosensores *de masa*. Actualmente los biosensores electroquímicos son los más utilizados. Este hecho se debe a una serie de ventajas:

- La naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas hace que sea posible monitorizar fácilmente volúmenes pequeños de muestra. Esto hace que los

biosensores electroquímicos sean especialmente adecuados para la monitorización "in vivo".

- La señal obtenida es eléctrica, y por tanto es viable la transducción directa de la velocidad de la reacción en la señal de lectura.
- Los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} M, son suficientes y adecuados para la determinación de numerosos analitos de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.
- Sin embargo, los sensores electroquímicos tienen dos principales inconvenientes:
- Su selectividad es relativamente baja, si bien este inconveniente puede minimizarse drásticamente utilizando un sistema de reconocimiento biológico que posea una alta selectividad para ciertos analitos.
- Es necesario emplear un electrodo de referencia que mantenga constante el potencial durante el transcurso de la medida a lo largo de un amplio periodo de tiempo.

Dentro de los biosensores electroquímicos, los de mayor interés son los biosensores amperométricos, los cuales monitorizan corrientes faradaicas resultantes del intercambio electrónico entre el sistema de reconocimiento biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. Junto con estos, los voltamperométricos, empleando técnicas de medida como la voltamperometría diferencial de impulsos y la de onda cuadrada, proporcionan elevados niveles de sensibilidad.

Atendiendo a la *naturaleza del proceso de reconocimiento biológico*, se distinguen dos grupos: los *biosensores catalíticos*, cuyos sistemas biológicos pueden ser enzimas, tejido o microorganismos, y los *biosensores de afinidad*, entre los que se encuentran

los inmunosensores y los basados en quimiorreceptores y macromoléculas proteicas (ácidos nucleicos, carbohidratos, ADN, ARN).

1.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Entre los biosensores catalíticos, los enzimáticos son, sin duda, los más utilizados. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En estas reacciones enzimáticas, la molécula transformada se denomina *sustrato* y normalmente implica el uso de otro reactivo llamado *cofactor* para poder generar los correspondientes *productos*, previa formación del complejo enzima – sustrato (Figura 2).

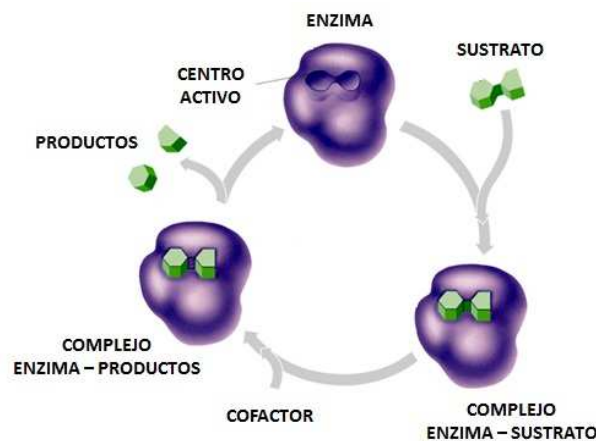


Figura 2. Esquema del funcionamiento de un sistema enzima-sustrato.

Alguna o todas las especies mencionadas pueden ser detectadas por medios fisicoquímicos proporcionando señales que, convenientemente procesadas, suministran la información requerida del analito. La reacción catalítica enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, combinándose así los factores de reconocimiento particular y de amplificación, necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de estos sensores. Además, el carácter catalítico hace que en su reacción con el sustrato, las enzimas se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Este hecho hace que, en principio, sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre en el caso de los anticuerpos cuando se emplean inmunosensores.

Si la reacción enzimática implica un solo sustrato, ésta puede ser formulada en general como:



Para una concentración fija de enzima, la velocidad de reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis – Menten:

$$v = \frac{[E_0]V_{max}}{K_M + [S]}$$

donde V_{max} es la velocidad máxima de la reacción y K_M es la constante de Michaelis – Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima.

En la *Figura 3* se muestra la dependencia típica de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato, señalándose los valores de los parámetros K_M y $V_{máx}$, y las zonas donde la señal obtenida es útil para la determinación del sustrato y para la determinación de la actividad enzimática. Desde el punto de vista analítico, a medida que la constante de Michaelis-Menten es más elevada, la sensibilidad del método disminuye, pero aumenta el intervalo de linealidad.

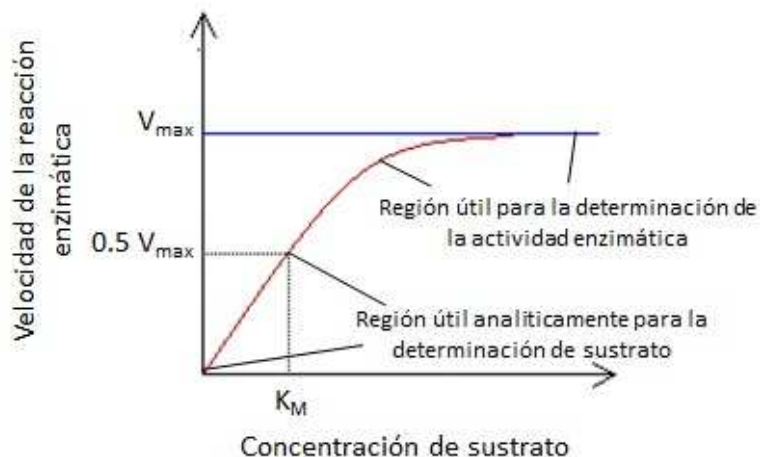


Figura 3. Dependencia de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato.

También es posible desarrollar biosensores enzimáticos en los que se empleen dos o más enzimas con los siguientes objetivos fundamentales:

- Aumentar la sensibilidad del método empleando una enzima auxiliar que regenere el sustrato o analito.
- Que la enzima auxiliar actúe catalíticamente sobre uno de los productos de la reacción enzimática principal con el fin de obtener un nuevo producto más fácilmente detectable.
- Que la enzima auxiliar catalice una reacción de especies potencialmente interferentes, de forma que éstas no puedan afectar a la reacción enzimática principal.

1.2. INMUNOSENSORES

En los biosensores de afinidad, el proceso de reconocimiento biomolecular se rige, en principio, por la forma y el tamaño del receptor y del ligando, por lo que dicho proceso está controlado por parámetros termodinámicos, a diferencia del control cinético que muestran los sistemas biocatalíticos. Dentro de este grupo de biosensores, los de mayor empleo y difusión son los inmunosensores, los cuales se basan en la reacción bioquímica que implica el reconocimiento de la forma del antígeno (Ag) por el anticuerpo (Ab), uniéndose por un punto concreto mediante la formación de múltiples enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, uniones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) para formar el complejo antígeno – anticuerpo.

Los anticuerpos son proteínas del tipo de las globulinas, de ahí su nombre de inmunoglobulinas (Igs), y son producidos de forma natural por el sistema inmunológico de los animales vertebrados, como respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que pueden ser una amenaza para el organismo. En la *Figura 4* se muestra la estructura básica de un anticuerpo.

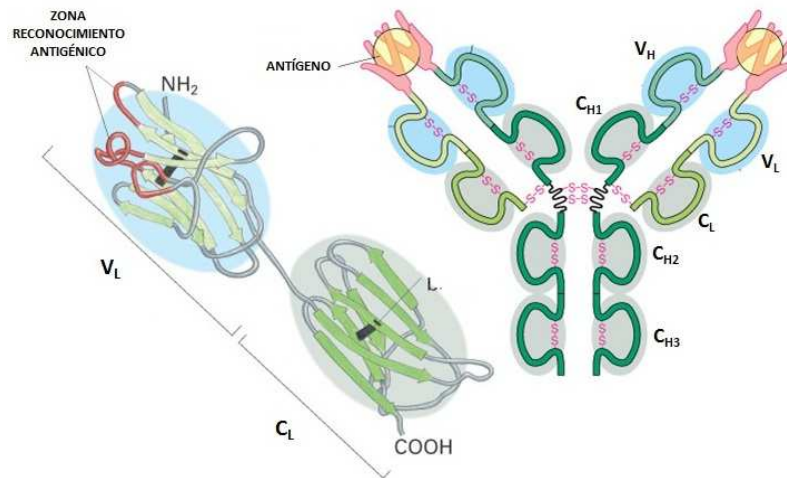
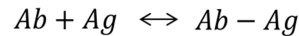


Figura 4. Estructura básica de un anticuerpo.

Las inmunoglobulinas tienen un peso molecular de unos 150 KD y están compuestas por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) iguales entre sí y dos pesadas (H), también iguales, unidas entre sí por puentes disulfuro y a una cadena ligera por otro puente disulfuro. Las cadenas presentan una región variable (V), situada en los dominios N terminales de cada cadena (V_L y V_H), que son características de cada anticuerpo. Los dominios C terminales son secuencias de aminoácidos casi constantes que constituyen la región constante del anticuerpo (C_H y C_L). Esta secuencia es la misma para inmunoglobulinas pertenecientes a la misma clase, difiriendo en los distintos tipos de inmunoglobulinas. Las zonas de reconocimiento antigénico se denominan parátomos, y vienen determinadas por la secuencia variable de los extremos amino terminales de cada cadena, siendo la responsable de la especificidad antigénica de un anticuerpo concreto. La porción de un antígeno que interviene en la reacción con un anticuerpo se denomina determinante antigénico o epítomo, pudiendo ser varios dependiendo del tamaño y complejidad del antígeno.

La interacción entre un único determinante antigénico y su parátomo correspondiente es reversible y viene determinada por la correspondiente constante de equilibrio de la reacción inmunológica, que recibe el nombre de constante de afinidad (K):



$$K = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]}$$

donde $[Ab - Ag]$ es la concentración del complejo antígeno – anticuerpo (complejo inmunológico), y $[Ab]$ y $[Ag]$ son las concentraciones de anticuerpo y antígeno libres, respectivamente, todas ellas en el equilibrio.

La gran selectividad de los anticuerpos viene dada por la estereoespecificidad de los puntos de unión con el antígeno, dando lugar a constantes de afinidad de entre 10^5 a 10^{12} . Esta especificidad de las uniones antígeno – anticuerpo ofrece la posibilidad de utilizar estos sistemas para el desarrollo de biosensores altamente específicos para el análisis en tiempo real de matrices complejas, sin necesidad de llevar a cabo un extenso pretratamiento de muestra o utilizar grandes volúmenes de la misma. Además, hoy en día pueden generarse anticuerpos a la carta contra casi todos los analitos, incluso si el analito es no inmunogénico, asociándose en estos casos a proteínas de transporte de alto peso molecular [Warsinke, 2000].

Sin embargo, la mayoría de inmunosensores desarrollados hasta la fecha presentan dos limitaciones principales:

- La elevada constante de afinidad de la interacción inmunoquímica hace que una regeneración óptima de las fases sensoras diseñadas sean cuando menos difícil y en muchos casos imposible, siendo normalmente sistemas de un solo uso. No obstante, el anticuerpo puede regenerarse por disociación de los complejos mediante la aplicación de distintos agentes que cambian las condiciones del medio y favorecen esta disociación, aunque estas condiciones suelen dañar la estructura del anticuerpo [Hall, 2002].
- La medida de la interacción inmunoquímica es normalmente difícil de realizar de manera directa. Así, muchos biosensores con estos sistemas de reconocimiento emplean reactivos marcados para la detección indirecta de la interacción antígeno – anticuerpo, lo cual implica la adición de otros reactivos no integrados en la fase sensora, así como tiempos de análisis más largos.

La aplicación de marcadores enzimáticos en los inmunosensores electroquímicos ha encontrado un amplio uso, siendo las enzimas peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa o catalasa las más empleadas. Las enzimas proporcionan productos que se pueden determinar fácilmente y, además, debido a su alto poder catalítico, se amplifica la señal, permitiendo alcanzar límites de detección más bajos.

Por otro lado, en la preparación de inmunosensores enzimáticos se han descrito diferentes configuraciones, siendo las más habituales las de tipo “sandwich” y el formato **competitivo** (Figura 5).

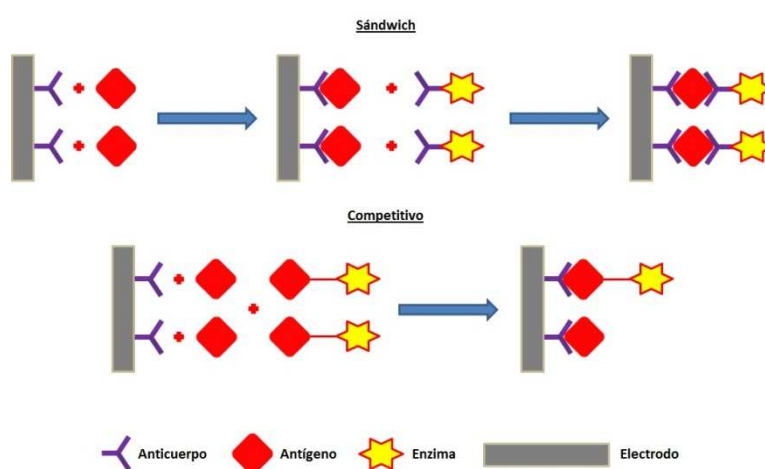


Figura 5. Esquemas de inmunoensayo de tipo “sandwich” y competitivo usados en la preparación de inmunosensores electroquímicos.

En los inmunosensores basados en un formato de tipo competitivo, el antígeno de la muestra (Ag) y el antígeno marcado con una enzima (Ag^*) compiten por los sitios de unión de un anticuerpo específico (Ab), en concentración limitante, que se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido. La monitorización de la reacción enzimática proporciona la información analítica requerida. Cuanto mayor sea la concentración de Ag en la muestra, menor Ag^* se unirá al Ab , siendo la medida inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Las curvas de calibrado, obtenidas representando la señal en función del logaritmo de la concentración de analito, tienen forma sigmoïdal y pueden ajustarse a la siguiente expresión:

$$S_n = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[analito]^b}{EC_{50}}\right)} + A_{min}$$

donde A_{max} es la máxima asíntota correspondiente a la señal en ausencia de analito, b es el valor de la pendiente de la curva en el punto de inflexión, EC_{50} es la concentración de analito en el punto de inflexión (concentración correspondiente al 50 % de la inhibición respecto a A_{max}) y A_{min} es la asíntota mínima que corresponde a la señal en exceso de analito.

Cuanto mayor es la constante de afinidad del antígeno por el anticuerpo, menor es el valor de EC_{50} . En este tipo de curvas, el intervalo dinámico (ID) se define como el intervalo de concentraciones de analito que produce una señal comprendida entre el 80 y el 20 % del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima. El límite de detección se calcula como la concentración de analito que origina una disminución de la señal de un 10 % respecto al blanco.

El inmunoensayo competitivo puede emplearse para el análisis de antígenos de elevado peso molecular y de haptenos. Sin embargo, la dependencia inversa de la concentración y la menor sensibilidad son los factores limitantes de este esquema de análisis.

En la configuración tipo “sandwich”, al anticuerpo inmovilizado en el transductor se une el antígeno (analito) a través de un epítopo y, a su vez, el anticuerpo marcado con una enzima se une a dicho antígeno a través de otro epítopo diferente. En este formato, cuanto mayor sea la concentración de Ag en la muestra, mayor Ab^* se unirá, siendo la medida directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. En general, el esquema “sandwich” proporciona un límite de detección un orden de magnitud más bajo que el formato competitivo, siendo su mayor limitación que no se puede usar para la determinación de haptenos.

1.3. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN

El buen funcionamiento de un biosensor electroquímico depende, en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. Los objetivos fundamentales de un buen proceso de inmovilización son:

- Permitir un íntimo contacto entre el elemento de reconocimiento biológico y el transductor, manteniendo inalterable, en la medida de lo posible, la estabilidad y la actividad de la biomolécula, evitando alteraciones conformacionales que pueda sufrir la misma en dicho proceso.
- Asegurar la orientación controlada de la biomolécula sobre la superficie del electrodo.

Los procedimientos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento o “crosslinking”, si bien dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y combinaciones. La inmovilización por adsorción es el método más sencillo, siendo sus mayores inconvenientes la aleatoriedad de la interacción con respecto a los grupos funcionales implicados en la biorreacción y que, debido a su naturaleza física, se trata de un proceso básicamente reversible, por lo que cambios en el medio pueden provocar la desorción de la biomolécula. En la inmovilización por atrapamiento, si bien tampoco existen interacciones químicas entre soporte y biomolécula, sí se puede evitar la desorción del componente biológico. En el caso de los biosensores electroquímicos, la estrategia de atrapamiento de enzimas durante el proceso de electrodeposición de polímeros conductores electrónicos ha proporcionado excelentes resultados [Ahuja, 2007]. Por otro lado, la fabricación de biocompósitos por inclusión física de las enzimas en el propio material del electrodo constituye una estrategia sencilla, regenerable y rápida para la preparación de biosensores electroquímicos [Serra, 2002]. En este campo, el empleo de electrodos de superficie nanoestructurada con materiales como los nanotubos de carbono o, sobre todo, las nanopartículas de oro, ha venido a mejorar las características analíticas de estas configuraciones, principalmente en lo

que se refiere a la sensibilidad de la detección y a la estabilidad de las biomoléculas [Pingarrón, 2008; Agüí, 2008].

Por otro lado, respecto a los métodos físicos, la inmovilización química ofrece algunas ventajas importantes, como son la estabilidad y reproducibilidad de la biocapa inmovilizada sobre el sustrato, la posibilidad de conseguir un alto grado de recubrimiento uniforme de la superficie del electrodo, la reducción del número de posibles orientaciones aleatorias que la proteína puede adoptar en la superficie, y la baja pérdida de material biológico. Sin embargo, cuando las biomoléculas se enlazan covalentemente en soportes sólidos, normalmente su capacidad de enlace específica es menor que cuando éstas se encuentran en disolución. Las principales razones para esta reducción de actividad se deben, por un lado a la orientación al azar de las biomoléculas y, por otro, a los múltiples sitios de unión de la proteína con el soporte sólido, lo cual impide el acceso al sitio activo, en el caso de las enzimas, o a la zona de reconocimiento antigénico, en el caso de los anticuerpos [Yuanyuan, 2006].

Para la preparación de inmunosensores se han desarrollado algunos métodos de inmovilización específicos. Se ha visto que, en general, la unión covalente de los anticuerpos al soporte empleando succinimida, carbodiimida, iodato o glutaraldehído, produce una pérdida de bioactividad, debido a que los puntos de unión pueden situarse más o menos cerca de los parátomos, lo que hace que, en ocasiones, la orientación espacial del anticuerpo inmovilizado impida la formación del inmunocomplejo [Lu, 1996]. Por otro lado, las configuraciones basadas en monocapas de tioles autoensambladas (SAMs) se caracterizan por presentar una menor adsorción inespecífica y un mejor control de la orientación de los anticuerpos, lo que se consigue introduciendo ligandos complementarios a los sitios enlazantes de las proteínas [Abad, 2002]. La unión por afinidad también proporciona una excelente orientación de los anticuerpos. Dentro de este tipo de inmovilización se ha estudiado en gran detalle la interacción entre la proteína A – anticuerpo. La proteína A es un polipéptido de 42 kDa constituyente habitual de la pared del *Staphylococcus aureus* que tiene cuatro lugares de unión potenciales a estas biomoléculas y es bifuncional, permitiendo la formación de complejos multiméricos con las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada del anticuerpo. La unión implica la formación de un conjunto de enlaces no

covalentes entre los aminoácidos de la región F_c y la proteína A. Este tipo de interacciones, aunque de manera individual son débiles, en conjunto tienen una energía de unión que equivale o supera a un enlace de naturaleza covalente. Por otro lado, la unión de los anticuerpos a estos receptores F_c permite dejar libres los sitios de unión al antígeno, eliminándose así los inconvenientes de la orientación al azar de los anticuerpos sobre los soportes sólidos [Lu, 1996]. La proteína G posee propiedades similares [Jung, 2007]. Otras estrategias de inmovilización de anticuerpos, son las basadas en la unión específica avidina o estreptavidina – biotina [Hausling, 1991], y en la interacción ácido bórico – glicoproteína [Yoo, 2002].

Desde hace algunos años se dispone de un material en forma de micropartículas con propiedades magnéticas, muy apropiado para la inmovilización de anticuerpos. El empleo de este material facilita enormemente las etapas de preparación de los inmunosensores y la detección [Centi, 2007], lográndose diseños que poseen, en general, mejores límites de detección y efectos matriz más bajos que las configuraciones convencionales equivalentes [Zacco, 2007]. Debido a que en este trabajo se ha preparado un inmunosensor basado en esta metodología, a continuación se revisan brevemente sus características.

1.4. MAGNETOINMUNOSENSORES

Las partículas magnéticas (MBs) constituyen una herramienta muy útil y versátil para la preparación de plataformas inmunosensoras. Es por ello por lo que, desde hace algunos años vienen desarrollándose configuraciones basadas en su empleo, que han recibido el nombre de magnetoinmunosensores [Richardson, 2001]. La elevada superficie activa de estas partículas permite la inmovilización de una alta concentración de biomoléculas (antígenos o anticuerpos) que, posteriormente, tras las correspondientes etapas de lavado y conjugación, pueden ser incorporadas a la parte activa del transductor mediante la aplicación de un campo magnético [Zacco, 2007].

Existen distintos tipos de micropartículas magnéticas funcionalizadas con diversos grupos o posiciones enlazantes capaces de interactuar con las posiciones de unión de otros tantos tipos de antígenos y anticuerpos. Esto hace que las MBs sean de gran utilidad para una gran variedad de estrategias de inmunoensayo. Por ejemplo, entre

otras, se dispone de micropartículas magnéticas carboxiladas y tosiladas, para inmovilización covalente, así como de otras modificadas con estreptavidina, para interaccionar con moléculas biotiniladas, o con proteína A o proteína G, para la inmovilización por afinidad.

El uso de MBs facilita la aplicación práctica de las técnicas de inmunoensayo y la detección. En primer lugar, después de realizar cada etapa de conjugación sobre las micropartículas, éstas se pueden separar con ayuda de un pequeño imán y proceder a la operación de lavado. Por otro lado, en el caso de los inmunosensores electroquímicos, una vez preparado el conjugado completo, éste puede atraparse del mismo modo sobre la superficie del electrodo. De esta forma se logra un efecto de preconcentración de inmunoreactivos en la superficie del transductor, lo que hace posible alcanzar bajos límites de detección. Además, es posible evitar los efectos matriz, así como medir volúmenes pequeños de muestra [Centi, 2007].

Con el fin de ilustrar la utilidad de esta metodología, en la *Tabla 1* se muestran algunos ejemplos de inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de micropartículas magnéticas

Tabla 1. Inmunosensores con micropartículas magnéticas (MBs): magnetoinmunosensores.

Electrodo	Partículas magnéticas	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de Inmunoensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
Capa fina de oro (~300 nm) sobre soporte de silicio	MBs-Estreptavidina	Afinidad específica por el anticuerpo biotinilado	Atrazina	–	Directo	–	EIS	IL: 10-600 ng mL ⁻¹	[Helali, 2006]
SPE de carbono	MBs-Prot G	Afinidad específica por la región Fc del anticuerpo	PCBs	Sedimentos marinos	Competitivo directo	Fosfatasa Alcalina	DPV naftilfosfato	IL: 1x10 ⁻⁴ -20 µg mL ⁻¹ LOD=0.4 ng mL ⁻¹ EC ₅₀ = 24 ng mL ⁻¹	[Centi, 2007]
m-GEC	MBs-Tosilo	Covalente	Sulfapiridina	Leche	Competitivo directo	Peroxidasa de rábano	Amperometría E _{ap} =-0.15 V H ₂ O ₂ -HQ	IL: 4.2-175 µg L ⁻¹ LOD=1.44 µg L ⁻¹ EC ₅₀ =25.5 µg L ⁻¹	[Zacco, 2007]
ITO modificado con ferroceno	MBs-Tosilo	Covalente	IgG de ratón	–	Sandwich	AuNPs	DPV p-nitrofenol-NaBH ₄	LOD=100 ag mL ⁻¹	[Selvaraju, 2008]
m-GEC	MBs-Tosilo	Covalente	Ácido Fólico	Leche	Competitivo indirecto	Peroxidasa de rábano	Amperometría E _{ap} =-0.15 V H ₂ O ₂ -HQ	IL: 21.1-129.3 nM LOD=13.1 nM EC ₅₀ =46.6 nM	[Lermo, 2009]
m-GEC	MBs-anti-Salmonella	–	<i>Salmonella</i>	Leche	Sandwich	Peroxidasa de rábano	Amperometría E _{ap} =-0.1 V H ₂ O ₂ -HQ	LOD=7.5x10 ³ cfu mL ⁻¹ y 0.108 cfu mL ⁻¹ (preenriquecido 8h)	[Liébana, 2009]
PGE modificado con AuNPs	MBs-COOH	Covalente	PSA	Suero humano	Sandwich	Peroxidasa de rábano	Amperometría E _{ap} =-0.2 V H ₂ O ₂ -HQ	IL: 1-10 pg mL ⁻¹ LOD=0.5 pg mL ⁻¹	[Mani, 2009]
SPE de oro modificado con TTF	MBs-Prot A	Afinidad específica por la región Fc del anticuerpo	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Orina	Sandwich	Peroxidasa de rábano	Amperometría E _{ap} =-0.15 V H ₂ O ₂ -TTF	IL: 4.3x10 ⁴ -1x10 ⁷ cfu mL ⁻¹ (Dawn) y 7.5x10 ⁵ -1x10 ⁸ cfu mL ⁻¹ (R6) LOD=1.5x10 ⁴ cfu mL ⁻¹ (Dawn) y 6.3x10 ⁵ cfu mL ⁻¹ (R6)	[Campuzano, 2010]

Tabla 1. Inmunosensores con micropartículas magnéticas (MBs): magnetoinmunosensores (cont.).

Electrodo	Partículas magnéticas	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de Inmunoensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
SPE de carbono	MBs-Tosilo	Covalente	anti-Hepatitis B	Suero humano	Sandwich	AuNPs	Cronoamp. $E_1=1.35$ V (1 min) $E_2=-1$ V (5 min)	IL: 5-69.2 mIU mL ⁻¹ LOD= 3 mIU mL ⁻¹	[Escosura-Muñiz, 2010]
SPE de carbono	MBs-Prot G	Afinidad específica por la región Fc del anticuerpo	Zearalenona	Alimentos para bebés	Competitivo directo	Peroxidasa de rábano	DPV H ₂ O ₂ -HQ	LOD=0.007 µg L ⁻¹ EC ₅₀ =0.088 µg L ⁻¹	[Hervás, 2010]
SPE de carbono	MBs-Prot A	Afinidad específica por la región Fc del anticuerpo	Cortisol	Suero humano	Competitivo directo	Fosfatasa alcalina	DPV naftilfosfato	IL: 5x10 ⁻³ -150 ng mL ⁻¹ LOD=3.5 pg mL ⁻¹ EC ₅₀ =0.19 ng mL ⁻¹	[Moreno-Guzmán, 2010]
SPE de carbono	MBs-Tosilo	Covalente	Dioxinivalenol	Cereales	Competitivo indirecto	Peroxidasa de rábano	Amperometría $E_{ap}=-0.1$ V H ₂ O ₂ -TMB	IL: 100-4500 ng mL ⁻¹ LOD=63 ng mL ⁻¹ EC ₅₀ =380 ng mL ⁻¹	[Romanazzo, 2010]
SPE de carbono	MBs-Estreptavidina	Afinidad específica por el antígeno biotinilado	Ácido okadaico	Mejillón	Competitivo indirecto	Fosfatasa Alcalina	DPV naftilfosfato	LOD=0.38 µg L ⁻¹ EC ₅₀ =3.15 µg L ⁻¹	[Hayat, 2011]
SPE de carbono	MBs-Estreptavidina	Afinidad específica por el anticuerpo biotinilado	Prolactina	Suero humano	Sandwich	Fosfatasa Alcalina	DPV naftilfosfato	IL: 10-2000 ng mL ⁻¹ LOD=3.74 ng mL ⁻¹	[Moreno-Guzmán, 2011]

Abreviaturas utilizadas: AuNPs: nanopartículas de oro; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica; Fc: región constante del anticuerpo; HQ: hidroquinona; IgG: inmunoglobulina G; IL: intervalo lineal; ITO: oxido de indio y estaño; LOD: límite de detección; MBs: partículas magnéticas; m-GEC: magnetocompuesto grafito-epoxi; PCBs: bifenilos policlorados; PGE: electrodo de grafito pirolítico; PSA: antígeno específico de la próstata; SPE: electrodos serigrafados; TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; TTF: tetratiofulvaleno.

Como puede observarse, en la mayoría de casos se utilizan electrodos serigrafiados (SPEs), debido a que al ser planos, resulta muy sencillo inmovilizar las micropartículas magnéticas sobre su superficie con ayuda del imán. Estas configuraciones se han empleado para la determinación de analitos de interés en las áreas del análisis ambiental, de alimentos y clínico. Por ejemplo, se ha desarrollado un inmunosensor para la detección de bifenilos policlorados (PCBs) en sedimentos marinos. Para su preparación, Centi y col. inmovilizaron el anticuerpo sobre micropartículas modificadas con proteína G, aprovechando su afinidad específica por la región Fc del anticuerpo. Tras el ensayo competitivo, las partículas magnéticas modificadas se inmovilizaron sobre un SPCE y se midió la respuesta en DPV del producto de la reacción enzimática catalizada por la fosfatasa alcalina [Centi, 2007]. Se observó que el empleo de MBs conducía a límites de detección dos ordenes de magnitud menores que los obtenidos cuando el inmunoensayo se realizaba directamente sobre la superficie del electrodo sin emplear partículas magnéticas. El uso de MBs mejora el rendimiento de la reacción de afinidad debido no sólo a que el área superficial es más elevada, sino también porque la cinética de la reacción es más rápida. Además, la superficie electródica activa resulta más accesible para la difusión del producto enzimático. Empleando micropartículas modificadas con proteína G, también se ha desarrollado un inmunosensor para la determinación de zearalenona en alimentos para bebés [Hervas, 2010].

Las micropartículas modificadas con proteína A cuentan también con varias aplicaciones recientes. Por ejemplo, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un inmunosensor tipo “sandwich” para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en orina empleando micropartículas modificadas con proteína A y electrodos serigrafiados de oro (SPAuE) con TTF inmovilizado [Campuzano, 2010]. También se ha preparado un inmunosensor competitivo directo basado en estas mismas micropartículas para la determinación de cortisol en muestras de suero, consiguiéndose un límite de detección de 3.5 pg mL^{-1} , veinte veces menor que los obtenidos con otros inmunosensores descritos en la bibliografía [Moreno-Guzmán, 2010]. Las micropartículas magnéticas modificadas con avidina o estreptavidina se pueden utilizar para enlazar fácilmente biomoléculas biotiniladas a su superficie. Esta

estrategia ha sido seguida para desarrollar un inmunosensor de tipo “sandwich” para la determinación de prolactina en suero humano [Moreno-Guzmán, 2011].

La inmovilización covalente de la biomolécula en la superficie de las micropartículas magnéticas también permite lograr configuraciones de inmunosensores electroquímicos de alta sensibilidad. Cabe destacar el inmunosensor amperométrico desarrollado por Escosura-Muñoz y col. para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis B [Escosura-Muñiz, 2010]. Para su preparación, el antígeno HBsAg se inmovilizó covalentemente sobre micropartículas magnéticas tosilladas y se realizó un ensayo tipo sándwich empleando AuNPs como marcador electroactivo. El límite de detección obtenido con este diseño, 3 mIU mL^{-1} , es suficiente para garantizar la detección de los niveles de seroprotección ($\geq 10 \text{ mIU mL}^{-1}$). Otro ejemplo basado en este tipo de inmovilización es el inmunosensor desarrollado por Mani y col. para la detección amplificada del antígeno específico de la próstata (PSA), empleado como marcador del cáncer de próstata desde 1988 [Mani, 2009]. Para su preparación se empleó un bioconjugado preparado por unión covalente de anti-PSA y HRP sobre la superficie de micropartículas modificadas con grupos carboxilo empleando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). La gran cantidad de marcador enzimático inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas permitió alcanzar un límite de detección de 0.5 pg mL^{-1} en suero humano.

Se han preparado otros formatos de magnetoinmunosensores atrapando las micropartículas magnéticas modificadas dentro de una matriz compósita que contiene un imán en su interior. Como ejemplo puede destacarse el diseño de un inmunosensor basado en un electrodo compósito de grafito-epoxi para la determinación de antibióticos sulfonamida en leche, empleando micropartículas magnéticas tosilladas para la inmovilización covalente del anticuerpo y HRP como marcador enzimático [Zacco, 2007]. El mismo grupo de investigación empleó el mismo formato para desarrollar un inmunosensor para la determinación de ácido fólico en leche [Lermo, 2009].

En los últimos años ha cobrado gran interés el diseño y empleo de nuevos materiales, tanto desde un punto de vista científico como tecnológico. En este sentido, el desarrollo de estructuras nanométricas supone una gran novedad respecto de las basadas en materiales macroscópicos, no solo en cuanto a su tamaño, favoreciendo la interacción a nivel celular con distintos agentes biológicos o bioquímicos, sino además y principalmente porque estas nanoestructuras poseen características físico-químicas diferentes [Vaseashta, 2005].

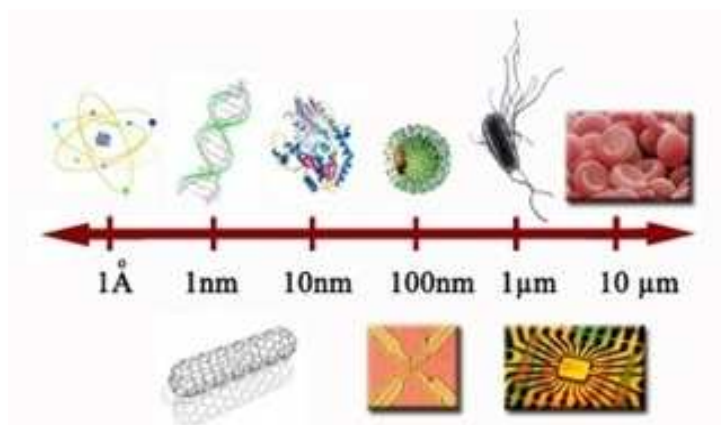


Figura 6. Distintos tipos de materiales y escala de tamaños.

Las propiedades de los materiales dependen de cómo estén ordenados los átomos que los constituyen y de cómo se comporten los electrones que se mueven en su seno. En relación a los materiales a escala macroscópica, la mayor relación

superficie/volumen de los nanomateriales hace que sean químicamente más reactivos y, por tanto, que haya cambios en sus propiedades básicas. Además, por debajo de unos pocos nanómetros, las leyes clásicas de la física dejan paso, y los electrones comienzan a comportarse según la mecánica cuántica.

Desde el punto de vista de sus aplicaciones analíticas, hoy en día se ha demostrado que los nanomateriales pueden ser utilizados para mejorar o innovar las etapas del proceso analítico, bien sea explotando su tamaño nanométrico, en aquellas áreas en las que interese la miniaturización, o también sus excepcionales propiedades. En el campo de la electroquímica, el uso de estos materiales ha hecho posible la preparación de superficies electródicas nanoestructuradas en las que se aprovechan los nuevos avances en la tecnología de sensores, así como también el amplio margen de posibilidades existentes, basadas o no en el empleo de sistemas biológicos y en la aplicación de distintos esquemas de (bio)ensayo-transducción. Los electrodos nanoestructurados han demostrado ya importantes ventajas generales respecto de los electrodos convencionales: por un lado, su presencia facilita las reacciones de transferencia de carga; además se observan efectos electrocatalíticos que en muchos casos hacen posible una disminución del valor del potencial de medida y, finalmente, las superficies nanoestructuradas son más resistentes al ensuciamiento por los productos electródicos u otras especies presentes en disolución. Estas ventajas afectan y mejoran las propiedades electroanalíticas básicas, como son la sensibilidad y la selectividad de los métodos, y la repetibilidad de las medidas.

2.1. NANOTUBOS DE CARBONO

Desde que, en 1985, se llevara a cabo el descubrimiento del fullereno C_{60} por Curl, Kroto y Smalley [[Kroto, 1985](#)], el estudio de las nanoestructuras derivadas del carbono se ha convertido en una de las áreas de investigación más destacadas en ciencia. Poco tiempo después, en 1991, Iijima observó, en la preparación de fullerenos, la formación de especies con forma de aguja, constituidas por estructuras tubulares concéntricas que contenían entre 2 y 50 láminas de grafeno, denominadas hoy en día nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) [[Iijima, 1991](#)]. Esta revelación se completó dos años más tarde con el hallazgo simultáneo, por Iijima [[Iijima, 1993](#)] y Bethune

[Bethune, 1993], de que la adición de algunos elementos metálicos como Fe o Co en el método de producción de MWCNTs, originaba estructuras tubulares con una única lámina de grafeno, conocidas como nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNTs) (Figura 7).

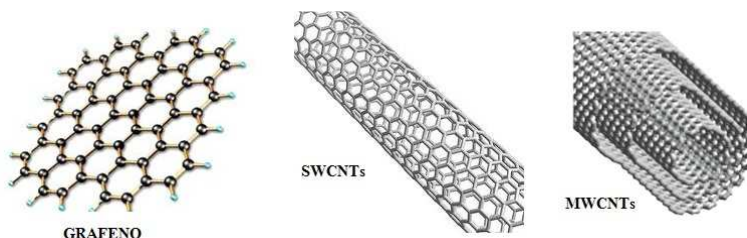


Figura 7. Estructuras del grafeno y de los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) y múltiple (MWCNTs).

Los nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNTs) están formados por una lámina de grafeno, constituida por anillos hexagonales de átomos de carbono con hibridación sp^2 , curvada y cerrada, mientras que los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) contienen varias unidades de nanotubos de pared simple concéntricos. Estas estructuras son consideradas unidimensionales debido a que tienen diámetros de pocos nanómetros y longitudes de hasta varios micrómetros.

La capacidad de presentar diferentes formas alotrópicas que caracteriza al carbono, ha dado lugar a la observación y preparación de una gran diversidad de nanoestructuras, con fascinantes geometrías y propiedades, tales como fullerenos endoédricos, nanocebollas de carbono (nano – onion), nanotubos de carbono con forma de cuencos apilados (cup – stacked nanotubes), con forma de punta o nanocuernos (carbón nanohorn), con forma toroidal (nanotori), híbridos de nanotubos y fullerenos (nanobuds), y grafenos [Delgado, 2008]. Algunas de estas nanoestructuras se presentan en la Figura 8.

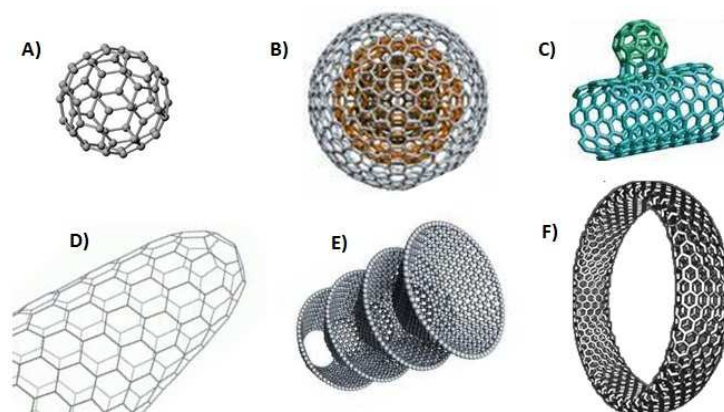


Figura 8. Distintas formas geométricas de grafeno y nanotubos de carbono: A) fullereno C_{60} B) fullerenos endoédricos C) carbon nanobud D) carbon nanohorn E) cup-stacked nanotubes F) carbon nanotori.

Por otro lado, los nanotubos de carbono se presentan habitualmente formando racimos de diferente diámetro y contienen defectos tanto en los extremos como en la pared lateral. Estos defectos pueden afectar a las propiedades intrínsecas de los nanotubos, pero también constituyen puntos de inicio para su funcionalización. Algunos de estos defectos son: (A) la presencia de anillos pentagonales (nanotubos bamboo) o heptagonales, (B) de átomos de carbono con hibridación sp^3 , o (C) de daños producidos por el empleo de condiciones de purificación fuertemente oxidantes (Figura 9).

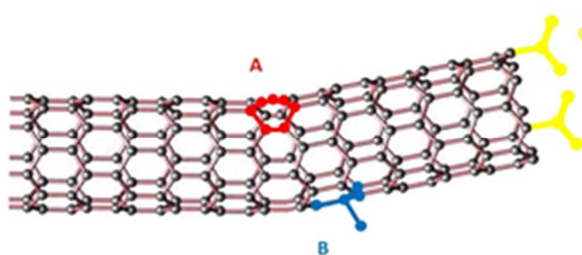


Figura 9. Defectos observables en los nanotubos de carbono: A) anillos penta- o hexagonales; B) carbono sp^3 ; C) grupos carboxílicos producidos por oxidación.

Los principales procesos de síntesis de nanotubos de carbono son los métodos de descarga por arco, de vaporización por láser y de deposición química, habiéndose demostrado que la actividad electrocatalítica de este material depende del protocolo de producción empleado, así como de los agentes dispersantes utilizados para su

inmovilización sobre la superficie electrónica [Lawrence, 2005]. Independientemente del método empleado, el crudo de reacción siempre contiene carbono amorfo e impurezas metálicas que pueden alterar sus propiedades. Este hecho hace necesaria la disolución de los residuos metálicos y carbonáceos, para lo cual existen distintos métodos de purificación [Aqel, en prensa]. El método de purificación más comúnmente empleado consiste en el tratamiento oxidativo con ácidos. Al efectuar este tratamiento, tiene lugar un acortamiento de la longitud de los nanotubos por degradación oxidativa de enlace C–C. Además, los nanotubos se abren por sus extremos y aparecen grupos oxigenados (Figura 10).

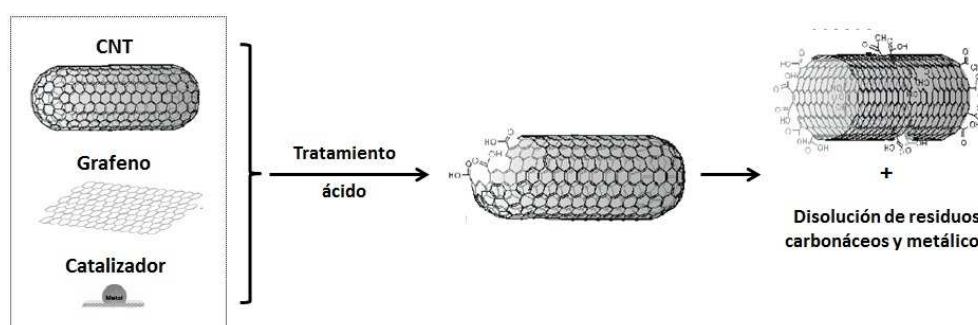


Figura 10. Tratamiento ácido de los nanotubos de carbono.

Las características de los nanotubos de carbono dependen, de un modo general, de factores estructurales, como son el número de capas concéntricas que poseen, el diámetro del cilindro, o la forma en que la red hexagonal de grafeno se orienta y se enrolla sobre sí misma (quiralidad). Estos factores determinan su carácter semiconductor o metálico y, en general, sus excepcionales propiedades electrónicas, que los ha convertido en un nanomaterial de gran utilidad para la modificación de electrodos, los cuales, a su vez, resultan muy apropiados para la construcción de sensores y biosensores [Trojanowicz, 2006]. En 1996 se observó por primera vez la capacidad de los nanotubos de carbono para promover reacciones de transferencia electrónica en neurotransmisores [Britto, 1996]. Desde entonces, en el campo de la detección electroquímica se ha aprovechado su alta conductividad, elevada área superficial, resistencia a la tensión y estabilidad química, para la fabricación de superficies electrónicas sensibles y selectivas, que demuestran una excelente actividad electrocatalítica, y sobre las que se minimiza el ensuciamiento superficial debido a

distintos productos, destacando los relacionados con las reacciones enzimáticas, principalmente NADH y peróxido de hidrógeno [Agüí, 2008]. Por otro lado, desde el punto de vista de la preparación de biosensores, los nanotubos de carbono ofrecen algunas ventajas particulares. Las importantes son su biocompatibilidad y la capacidad de acumulación de biomoléculas, mejorando la transferencia electrónica directa entre el centro redox de la proteína y el electrodo [Rivas, 2007]. Estas propiedades se han aprovechado para la preparación de biosensores enzimáticos [Balasubramanian, 2006], genosensores [He, 2006] e inmunosensores [Veetil, 2007].

2.2. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO

Uno de los mayores problemas del uso de los nanotubos de carbono para la fabricación de (bio)sensores electroquímicos es la falta de solubilidad de este material en los disolventes habituales. Esto se debe a que su elevada área superficial, con enlaces π continuos, les confiere una gran tendencia a aglomerarse, formando “manojos” (bundles) de nanotubos que interactúan a través de fuerzas de Van der Waals [Vairavapandian, 2008]. A pesar de esta dificultad, en estos años se han desarrollado muchas configuraciones electrónicas basadas en el empleo de nanotubos de carbono. Por ejemplo, un método muy sencillo y ampliamente utilizado consiste en adsorber este material sobre la superficie del electrodo depositando sobre él un pequeño volumen de una suspensión de nanotubos preparada en un líquido adecuado (Nafion, dimetilformamida, disolución de tensoactivos o un líquido iónico, entre otros) [Agüí, 2008]. También se han preparado electrodos de pasta de nanotubos de carbono mezclándolos con aglutinantes del tipo del aceite mineral [Luque, 2006], las resinas epoxi [Pumera, 2006] o el Teflón [Manso, 2008].

Más recientemente, la preparación de nanotubos de carbono funcionalizados ha recibido una considerable atención. Los procedimientos que se utilizan alteran la energía superficial de este material y de este modo mejoran su compatibilidad con el disolvente, reduciendo su tendencia a formar aglomerados. Pero además, la funcionalización permite incorporar distintas especies (polímeros, nanopartículas, biomoléculas) a la superficie de los nanotubos de carbono, bien enlazándolas

covalentemente, o mediante interacción supramolecular [Tasis, 2006]. En la Figura 11 se muestran algunos ejemplos de funcionalización:

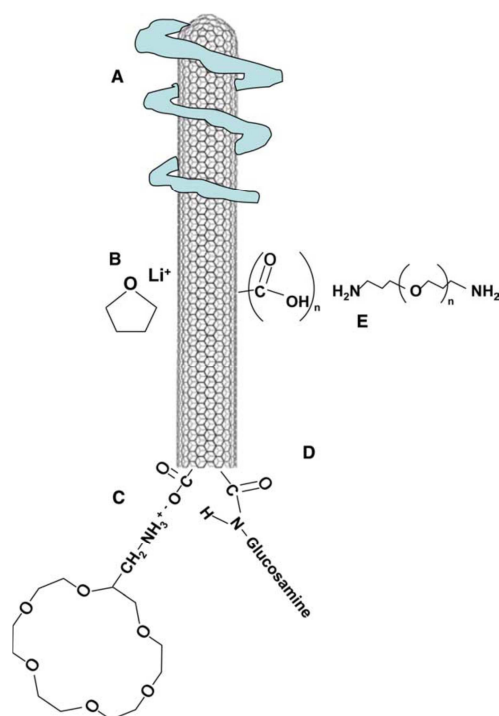


Figura 11. Funcionalización de nanotubos de carbono: (A) "wrapping" supramolecular; (B) interacción con un polielectrolito de Li^+ ; (C-E) uniones covalentes a través de grupos amino (C) con un éter corona, (D) la glucosamina, y (E) un derivado del polietilenglicol [Merkoçi, 2005].

La funcionalización no covalente de nanotubos de carbono constituye un método alternativo para la formación de complejos supramoleculares de gran estabilidad. Esto es debido a la simplicidad de los procedimientos y a que no afecta a la estructura de enlaces π conjugados de los nanotubos. Estos complejos se producen a través de interacciones $\pi - \pi$ o de tipo van der Waals entre el nanotubo y otras especies como derivados del pireno, tensoactivos, polímeros o ADN. Otro tipo de modificación no covalente es la funcionalización endoédrica. Los nanotubos de carbono, debido a su peculiar estructura, presentan una cavidad interna capaz de alojar diferentes especies como nanopartículas inorgánicas e incluso biomoléculas, lo cual es particularmente útil

para integrar las propiedades de ambos componentes en un material híbrido con importantes aplicaciones analíticas.

La funcionalización covalente en las paredes laterales está en ocasiones asociada con un cambio de hibridación de sp^2 a sp^3 . Esto se debe a que los carbonos sp^2 de las láminas de grafeno tienen un cierto grado de piramidalización, debido a que se encuentran plegadas sobre sí mismas, y favorecen las reacciones de adición como halogenación, cicloadición, hidrogenación y adición de radicales entre otras [Delgado, 2008]. Sin embargo, para la preparación de electrodos modificados, se utiliza más frecuentemente la funcionalización covalente a partir de los defectos superficiales presentes en los nanotubos de carbono. Estos defectos y, sobre todo los grupos carboxílicos que se generan en la pared de los nanotubos tras los procesos de purificación con ácidos, actúan como precursores de distintas reacciones químicas como por ejemplo amidación, esterificación y silanización. El inconveniente de utilizar esta estrategia, es que el sistema π conjugado del nanotubo se perturba significativamente al modificarse su estructura, variando consecuentemente sus propiedades electrónicas. Como ejemplo, en la *Figura 12* se muestra un esquema de preparación de nanotubos funcionalizados con polianilina por el método de "grafting" (injerto) [Reddy, 2009].

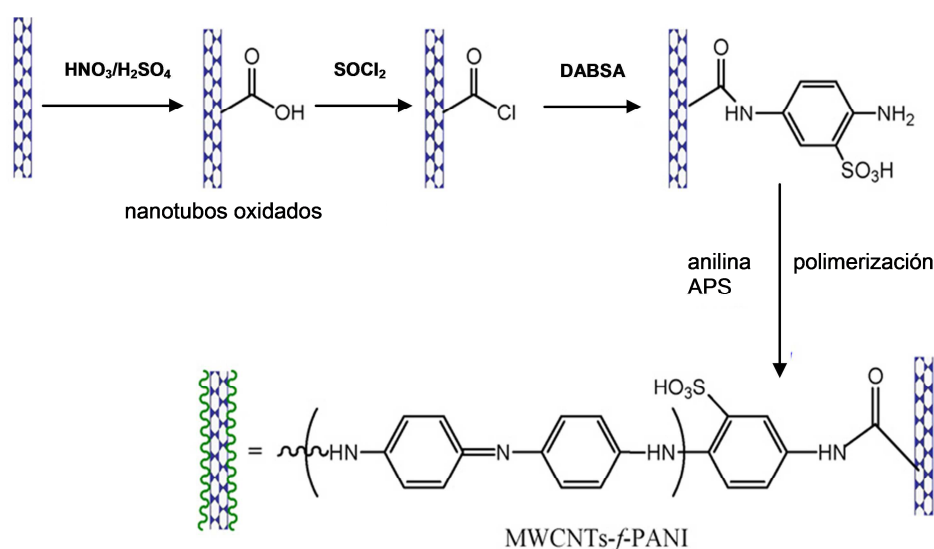


Figura 12. Funcionalización de los nanotubos de carbono con polianilina por el método de "grafting" [Reddy, 2009].

2.3. MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO

Desde hace algunos años se han descrito diversos materiales híbridos preparados por mezcla o incorporación física a los nanotubos de carbono de otras especies, principalmente polímeros y nanopartículas. En estos casos, al no existir ningún tipo de unión covalente a la pared de los nanotubos no se altera su estructura, pero el material mixto resultante exhibe nuevas y mejores propiedades, apreciándose un efecto sinérgico debido a la presencia de los distintos componentes.

2.3.1. POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS

Los polímeros conductores electrónicos (CPs) han sido y son hoy en día materiales con elevado interés científico para aplicaciones electrónicas, optoelectrónicas y biotecnológicas en el área de Electroquímica Analítica. Los polímeros conductores se han venido empleado en la preparación de biosensores, desempeñando aquéllos un papel importante tanto en el proceso de sensorización como en la inmovilización estable del biocomponente [Malhotra, 2006]. La presencia de estos materiales en la superficie del electrodo facilita la transferencia de carga generada en la reacción bioquímica, habiéndose observado en algunos casos la transferencia directa de electrones entre el centro redox de la biomolécula y la superficie del electrodo modificado con el polímero conductor [Jiang, 2006].

Como es sabido, los polien- derivados, como el poli(p-fenileno) o el poli(fenileno vinileno), y los compuestos poliaromáticos heterocíclicos como la poli(anilina), el poli(pirrol) o el poli(tiofeno) y sus derivados, presentan propiedades electroquímicas únicas debidas a su estructura. Los polímeros conductores electrónicos consisten en cadenas carbonadas con dobles enlaces extensamente conjugados. En esta estructura, los átomos de carbono poseen orbitales electrónicos π no enlazados donde los electrones están muy deslocalizados y tienen gran libertad de movimiento a lo largo de la cadena conjugada, induciendo propiedades como la conductividad electrónica, bajos potenciales de ionización, transiciones ópticas de baja energía y elevada afinidad electrónica. Sin embargo, para que estos polímeros sean conductores, los electrones deslocalizados necesitan el aporte de una gran cantidad de energía, debido a la elevada separación energética entre los orbitales π y los orbitales electrónicos

ocupados. Esta separación energética puede ser reducida mediante el proceso de dopado, que en los polímeros conductores es habitualmente de tipo p. En este tipo de dopado, un electrón se arranca de la estructura del polímero mediante el empleo de agentes oxidantes, como halógenos, o durante la electropolimerización al aplicar un potencial de oxidación sobre el electrodo de trabajo en contacto con el monómero, creándose una fuerte distorsión de la estructura conjugada y quedando la molécula cargada positivamente como consecuencia de la aparición de defectos no lineales denominados polarones o bipolarones que facilitan el tránsito de los electrones hacia los orbitales π . Estas cargas positivas son neutralizadas por la presencia de contraaniones que penetran en la película polimérica a través de los canales que se abren como consecuencia de la repulsión entre las fibras de polímero cargadas positivamente [Guimard, 2007]. En la Figura 13 se han representado, para el caso del poli(3-metiltiofeno), la forma reducida, neutra y no conductora, y la forma oxidada, en la que el polímero adquiere carga positiva y se dopa con los contraiones de la disolución, comportándose entonces como un conductor electrónico.

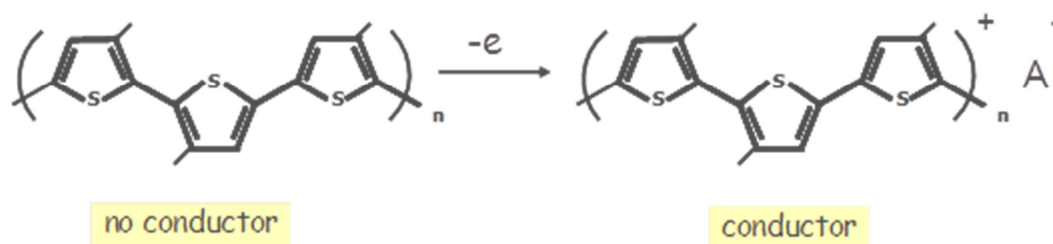


Figura 13. Formas no conductora y conductora del poli(3-metiltiofeno).

La posibilidad de obtener películas de CPs mediante electropolimerización, normalmente por métodos potencioestáticos o voltamperométricos, supone una ventaja añadida a la de sus propiedades, ya que éste es un procedimiento simple de preparación de superficies modificadas, permitiendo modular las propiedades electrónicas y mecánicas, así como el control preciso de la formación del polímero, de su morfología y del espesor del recubrimiento.

Recientemente se han descrito diversos métodos de inmovilización para mejorar la estabilidad de las biomoléculas sobre los polímeros conductores [Ahuja, 2007]. Uno de ellos es el método de adsorción física en el que se trabaja a un pH por encima del

punto isoeléctrico de la proteína. Como consecuencia, la biomolécula cargada negativamente queda retenida sobre la matriz policationica del polímero oxidado. Aunque se trata de un procedimiento simple, sin embargo este método presenta algunas desventajas como son, la poca cantidad de biomolécula inmovilizada y la posible pérdida de biomolécula durante la etapa de medida. Los problemas de estabilidad pueden resolverse en parte, haciendo uso de la inmovilización covalente, mediante unión química de la biomolécula a la superficie del polímero previamente funcionalizada.

Otro método de inmovilización empleado en los últimos años, con el fin de superar los problemas de reproducibilidad y de control espacial de la deposición, es el basado en el atrapamiento del material biológico dentro de la matriz polimérica. El proceso consiste en la oxidación electroquímica del monómero en presencia del biomaterial para formar el polímero, que incorpora entonces a las biomoléculas homogéneamente distribuidas durante su crecimiento, dando lugar a estructuras tridimensionales estables, donde las proteínas quedan protegidas al tiempo que mantienen su bioactividad. Este método ofrece ventajas, como son la de requerir una única etapa, ofrecer una gran reproducibilidad del recubrimiento completo de la superficie activa y tener un mayor control del grosor de la película polimérica y de la distribución espacial de la biomolécula. Además, este método asegura la proximidad entre el centro activo de la biomolécula y la superficie sensora.

Debido a las excelentes propiedades atribuidas a estos polímeros, principalmente su conductividad electrónica intrínseca y su actividad electrocatalítica, y a las ya comentadas de los nanotubos de carbono, en los últimos años la electrodeposición de polímeros conductores sobre matrices de nanotubos ha recibido una considerable atención. En la *Tabla 2* se resumen las características de algunas de las configuraciones más relevantes.

Como se ha señalado anteriormente, los materiales híbridos formados por incorporación de un polímero conductor electrónico a una superficie modificada con nanotubos de carbono poseen propiedades mejoradas respecto a las de ambos componentes por separado. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta la gran

superficie activa que proporciona la conjunción de ambos materiales y la formación de agregados polímero-nanotubos que pueden reducir la distancia de intercalación de los iones facilitando la transferencia de carga e incrementando la conductividad del recubrimiento polimérico [Luo, 2006].

Se han preparado electrodos modificados con materiales híbridos CNTs/CPs para la detección electroquímica de especies como nitrito [Guo, 2005], clorometanos [Santhanam, 2005], dopamina [Wang, 2006]_a, ácido ascórbico [Li, 2007] o amoníaco [Chen, 2007]. La adición de nanopartículas metálicas intensifica el efecto electrocatalítico hacia los procesos electroquímicos de compuestos como el metanol [Selvaraj, 2007] o el ácido fórmico [Zhu, 2008]. Los electrodos modificados con polianilina (PANI) y nanotubos de carbono muestran un intenso efecto electrocatalítico hacia la oxidación del peróxido de hidrógeno [Luo, 2006], efecto que se acentúa cuando se incorporan especies como el azul de Prusia (PB) [Zou, 2007]. De un modo similar se comportan los electrodos de poli(3-metiltiofeno) (P3MT/MWCNTs) con relación al NADH [Agüí, 2007].

Estos electrodos se han utilizado también para preparar biosensores enzimáticos, principalmente para la determinación de glucosa, empleando sobre todo polipirrol [Gao, 2003; Wang, 2005; Tsai, 2006]. También se han desarrollado biosensores para analitos como la colina [Qu, 2005] o el colesterol [Dhand, 2008], incorporando las enzimas específicas inmovilizadas sobre electrodos modificados con nanotubos de carbono y polianilina (PANI). Finalmente, se han diseñado biosensores de afinidad, por incorporación de anticuerpos específicos para la detección de antígenos como el de la hepatitis B (HBsAg) [Hu, 2011] o la gonadotropina coriónica humana (HCG) [Wang, 2010]_a, así como sensores de hibridación basados en la inmovilización de cadenas simples de ADN sobre la superficie de electrodos modificados con PPy/MWCNTs con ayuda de micropartículas magnéticas [Cheng, 2005].

Tabla 2. Electrodo modificado con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos.

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
GOx/PPy/MWCNTs/AuE	Se preparan SWCNTs alineados verticalmente sobre una lámina de oro por pirólisis de ftalocianina de Fe(II). Después se coinmoviliza GOx durante la electropolimerización de PPy aplicando un potencial de oxidación de 1 V durante 1 min en una disolución del monómero pirrol en presencia de anión perclorato.	Detección de glucosa	[Gao, 2003]
PDMA/MWCNTs/ITO	Se sintetiza PDMA/MWCNTs por oxidación química con persulfato amónico del monómero 2,5-dimetilanilina en presencia de MWCNTs. Se preparan monocapas sobre un ITO.	Caracterización del material	[Bavastrello, 2004]
GOx/anf-pirrol/Fc-SWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de SWCNTs funcionalizados con ferroceno que contiene el monómero pirrol anfifílico y GOx. A continuación se deposita la mezcla en un GCE y se coinmovilizan los Fc-SWCNTs y la GOx durante la electropolimerización de PPy aplicando un potencial de oxidación de 0.75 V en presencia de anión perclorato.	Detección amperométrica de glucosa con Fc- SWCNTs como mediador redox ($E_{ap}=0.5$ V): $m=0.28$ mA M ⁻¹ cm ⁻²	[Callegari, 2004]
PPy/MWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados que contiene el monómero pirrol. A continuación sobre un GCE se coinmovilizan los MWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un barrido de potencial mediante CV (0 - 0.7V) (n=8). Se preparan las MNPs a partir de FeSO ₄ y FeCl ₃ añadiendo NH ₃ . Las MNPs tioladas se obtienen haciendo reaccionar las MNPs con ácido mercaptoacético durante 8h. Para preparar las MNPs/DNA, se sumergen las MNPs-SH en una disolución de 5'-NH ₂ -oligo-nucleótido en imidazol con EDAC. A continuación se añade DNR como indicador de hibridación.	Sensor de hibridación. Medida por DPV de la señal de reducción de DNR: LOD=2.3×10 ⁻¹⁴ M	[Cheng, 2005]
PANI/MWCNTs/AuE	Se depositan MWCNTs carboxilados suspendidos en agua sobre un AuE. Después se lleva a cabo la electropolimerización galvanostática de PANI aplicando una corriente de oxidación de 0.2827 μA durante 200 s en una disolución de anilina en H ₂ SO ₄ .	Determinación amperométrica de nitrito ($E_{ap}=0.0$ V): IL: 5 μM – 0.015 M LOD: 1 μM $m=719.2$ mA M ⁻¹	[Guo, 2005]
BSA-GA/COx/{MWNTs/PANI} ₅ / {PANI} ₃ /GCE	Se depositan MWCNTs carboxilados en etanol sobre un GCE. Después se lleva a cabo la electropolimerización de PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.2 - 1.0 V vs. SCE) (n=6) en una disolución de monómero anilina en H ₂ SO ₄ . Este proceso se repite cinco veces y a continuación se electrodepositan tres capas más de PANI. Finalmente la COx se inmoviliza sobre el {MWNTs/PANI} ₅ / ₃ /GCE por entrecruzamiento con BSA y GA.	Determinación amperométrica de colina ($E_{ap}=0.4$ V): IL: 2 μM – 2 mM LOD= 0.3 μM	[Qu, 2005]
PEO/P3MT/MWCNTs	Se prepara una mezcla del monómero 3-metiltiofeno con MWCNTs carboxilados en presencia de FeCl ₃ en cloroformo y se agita durante 24h. El compuesto P3MT/MWCNTs se mezcla con PEO y la pasta se coloca entre dos electrodos de Pd.	Detección de clorometanos	[Santhanam, 2005]
GOx/PPy/MWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados que contiene GOx y el monómero pirrol. A continuación sobre un GCE se coinmovilizan GOx y MWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un potencial de oxidación de 0.7 V durante 10 min.	Determinación amperométrica de glucosa ($E_{ap}=0.9$ V): IL: 0-50 mM LOD: 0.2 mM $m=2.33$ nA mM ⁻¹	[Wang, 2005]

Tabla 2. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
NiHCF/PANI/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs suspendidos en DMF sobre un GCE. Después se electropolimeriza PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.2 - 0.7 V) (n=15) en una disolución de monómero anilina en H ₂ SO ₄ . A continuación se sumerge el electrodo PANI/MWCNTs/GCE en una disolución de Ni(II) y Fe(CN) ₆ ³⁻ y se electropolimeriza NiHCF aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.85-0 V) (n=13).	Detección de ion cesio por CV	[Lin, 2006]
HRP/PANI/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs suspendidos en DMF sobre un GCE. Después se electropolimeriza PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.5-1.1 V) (n=7) en una disolución de monómero anilina en HCl. Para inmovilizar HRP, el electrodo PANI/MWCNTs/GCE primero se reduce en PBS aplicando un potencial de -0.5 V durante 400 s y después se oxida en una disolución de HRP aplicando un potencial de 0.7 V durante 800 s.	Determinación amperométrica de peróxido de hidrógeno (E _{ap} =-0.1 V): IL: 0.2 -19 μM LOD=68 nM m=44.3 μA mM ⁻¹	[Luo, 2006]
GOx/PPy/MWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en agua que contiene GOx y el monómero pirrol. A continuación sobre un GCE se coinmovilizan GOx y MWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un potencial de oxidación de 0.7 V (vs Ag/AgCl).	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} =0.9 V): IL: 0.25 - 4 mM m= 95 nA mM ⁻¹	[Tsai, 2006]
SWCNTs/P3MT/GCE	Se electropolimeriza P3MT sobre un GCE aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.0 - 1.7 V) (n=3) en una disolución de monómero 3-metiltiofeno y NaClO ₄ en acetonitrilo. A continuación se aplica un potencial de oxidación de 0.7 V durante 10 s y se lava el recubrimiento polimérico mediante CV (0.0-0.7 V) (n=10) en disolución reguladora de pH 7.0. Después se depositan SWCNTs suspendidos en Nafion.	Determinación de dopamina por DPV: IL: 0.02-0.1 μM, 0.1-1 μM y 1-6 μM LOD= 5 nM. Análisis de suero humano y medicamentos	[Wang, 2006]
P3MT/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs suspendidos en Nafión sobre un GCE. Después se electropolimeriza P3MT aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.0-1.7 V) (n=3) en una disolución de monómero 3-metiltiofeno y anión perclorato en acetonitrilo. A continuación se aplica un potencial de oxidación de 0.7 V durante 600 s y se lava el recubrimiento polimérico mediante CV (0.0-0.7 V) (n=10) en disolución reguladora de pH 7.0.	Determinación de amperométrica de NADH (E _{ap} =0.3 V) y Cit c (E _{ap} =0.0 V): IL: 0.5 – 20 μM (NADH) ; 0.1 – 40 μM (Cit c) LOD: 0.17 μM (NADH) m= 3x10 ⁶ nA M ⁻¹ (NADH)	[Agüí, 2007]
PPy/MWCNTs/AuE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en DMF que contiene persulfato amónico como agente oxidante y DBS. Después se deposita la mezcla sobre un electrodo interdigitado de oro. Finalmente el electrodo MWCNTs/AuE se pone en contacto con vapor del monómero pirrol durante 22h a 0 °C.	Detección de vapor de amoniaco: 50 – 12500 ppm	[Chen, 2007]
PPy/LOx/MWCNTs/PtE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en agua que contiene pirrol, LOx y lactato y se deja reaccionar para que tenga lugar la polimerización catalizada enzimáticamente. Finalmete se deposita la mezcla sobre un PtE.	Caracterización del material	[Cui, 2007]

Tabla 2. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
PoPD/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs carboxilados suspendidos en agua sobre un GCE. Después se electropolimeriza PoPD aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.25-1.05 V) (n=10) en una disolución de monómero o-fenilendiamina en presencia de anión sulfato.	Detección de oxígeno por CV	[Gajendran, 2007]
PPy/SWCNTs/proteína/GCE	Se prepara una suspensión acuosa de conjugados SWCNTs – proteína (BSA, HRP ó Cit c) en presencia del monómero pirrol. A continuación sobre un GCE se coinmovilizan la proteína y SWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un barrido de potencial por CV (-0.65 – 1.05 V) (n=50). Finalmente el electrodo PPy/SWCNTs/proteína/GCE se sobreoxida por CV (-0.2 – 1.3 V) (n=50).	Caracterización del material	[Kum, 2007]
PPy/SWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de SWCNTs en SDS en presencia del monómero pirrol. A continuación sobre un GCE se coinmovilizan los SWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un barrido de potencial por CV (-0.2 - 0.8 V). Finalmente el electrodo PPy/SWCNTs/GCE se sobreoxida aplicando un potencial de oxidación de 1.8 V durante 250 s.	Detección simultánea de ác. ascórbico, dopamina y ác. úrico. Detección de nitrato.	[Li, 2007]
PANI (ó PPy ó PEDOT) /MWCNTs/CE	Se preparan mezclas del monómero anilina (ó pirrol ó EDOT) y MWCNTs carboxilados y sobre un electrodo de grafito se electropolimeriza aplicando un potencial de oxidación de 1 V (ó 0.9 ó 1V, respectivamente).	Caracterización de los materiales	[Peng, 2007]
PtNPs-RuNPs/PPy/ MWCNTs /CE	Se sintetiza PPy/MWCNTs por oxidación química con persulfato amónico del monómero pirrol en presencia de MWCNTs. Sobre el compuesto PPy/MWCNTs se depositan nanopartículas de Pt y Ru por reducción con HCHO de las sales precursoras H ₂ PtCl ₆ y RuCl ₃ . Finalmente la suspensión del compuesto en acetona se deposita sobre un electrodo de grafito.	Detección de metanol por CV	[Selvaraj, 2007]
PPy/MWCNTs/ AuE	Se prepara una suspensión de MWCNTs en agua en presencia del monómero pirrol. A continuación sobre un AuE se coinmovilizan los MWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un potencial de oxidación de 0.7 V. Finalmente el electrodo PPy/MWCNTs/AuE se sobreoxida en medio NaOH aplicando un barrido de potencial mediante CV.	Determinación de dopamina por DPV: IL: 0.04 - 1.4 μM LOD=1.7 nM m=2.27 μA μM ⁻¹	[Tu, 2007]
PANI/MWCNTs/CE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en HNO ₃ en presencia del monómero anilina. A continuación sobre un electrodo de grafito se coinmovilizan los MWCNTs durante la electropolimerización galvanostática de PANI aplicando una corriente de oxidación de 1 mA (o mediante electropolimerización potencioestática aplicando un potencial de oxidación de 0.75 V) en HNO ₃ .	Caracterización del material	[Wu, 2007]
PB/PANI/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs carboxilados suspendidos en DMF sobre un GCE. Después se electropolimeriza PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.2 y 0.7 V) (n=10) en una disolución de monómero anilina en HCl. El electrodo PANI/MWCNTs/ GCE se sumerge en una disolución de K ₃ [Fe(CN) ₆] y FeCl ₃ , y se deposita PB aplicando un potencial de oxidación de 0.40 V durante 40 s. Finalmente se aplica un barrido de potencial mediante CV (-0.05 – 0.35 V) en medio HCl.	Determinación amperométrica de peróxido de hidrógeno (E _{ap} =0.0 V): IL: 8 nM - 5 μM LOD = 5 nM m= 526.43 μA μM ⁻¹ cm ⁻²	[Zou, 2007], a

Tabla 2. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
GA-Nf/GOx/PB-PANI/MWCNTs/GCE	Se prepara un material compósito PB-PANI a partir de una mezcla del monómero anilina, FeCl ₃ y K ₃ Fe(CN) ₆ en medio HCl. A continuación se prepara una suspensión de MWCNTs en DMF que contiene el compósito PB-PANI, se deposita sobre un GCE y se aplica un barrido de potencial mediante CV (-0.1 – 0.5 V) en medio HCl. Finalmente la GOx se inmoviliza sobre el PB-PANI/MWCNTs/GCE por entrecruzamiento con GA y Nafion.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} =0.0 V): IL: 1-11 mM LOD: 0.01 mM m=15.36 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	[Zou, 2007] _b
ChOx-PANI/MWCNTs/ITO	Se sintetiza PANI por oxidación química del monómero anilina con peroxodisulfato. A continuación se prepara una mezcla de una suspensión de PANI en ácido fórmico con otra de MWCNTs carboxilados en acetonitrilo y se deposita el compósito PANI/MWCNTs electroforéticamente sobre un ITO. Finalmente la enzima ChOx se inmoviliza covalentemente con EDC y NHS.	Determinación de colesterol por LSV (E _{ap} = 0.28 V): IL: 1.29 -12.93 mM m=6800 nA mM ⁻¹	[Dhand, 2008]
PANI/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs suspendidos en SDS sobre un GCE. Para la preparación del electrodo PANI/MWCNTs/GCE se electropolimeriza PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.2 - 0.8 V) en una disolución de monómero anilina en H ₂ SO ₄ .	Determinación de insecticidas (ISO, DCF y VOL) por AdSDPV: IL: 0.01 - 100 mg/L LOD =0.1 μg L ⁻¹ (ISO), 0.05 μg L ⁻¹ (DCF) y 0.01 μg L ⁻¹ (VOL)	[Manisankar, 2008]
GA-GOx/(PPy/SWCNTs) _n /Pt/PVDF	Se depositan multicapas de SWCNTs y PPy sobre una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) recubierta de Pt. Después se inmoviliza GOx por entrecruzamiento con GA.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} = 0.7 V): IL: 0 – 50 mM m= 7.06 μA mM ⁻¹	[Shirsat, 2008]
PoPD/SWCNTs/GCE	Se prepara una suspensión de SWCNTs carboxilados en SDS en presencia de monómero o-fenilendiamina. A continuación, sobre un GCE se coinmovilizan los SWCNTs durante la electropolimerización de PPy aplicando un barrido de potencial por CV (-0.5 - 1.0V) (n=30).	Determinación de colchicina por DPV. Análisis de preparados farmacéuticos: IL: 0.1-10 μM LOD=35 nM m=3.401 μA μM ⁻¹	[Zhang, 2008]
PtNPs/PANI/MWCNTs/PtE	Se prepara una suspensión de MWCNTs en H ₂ SO ₄ en presencia de monómero anilina. A continuación sobre un PtE se coinmovilizan los SWCNTs durante la electropolimerización de PANI aplicando un barrido de potencial por CV (-0.2 – 1.2 V) (n=25). Finalmente se electrodepositan nanopartículas de Pt por reducción a potencial constante de la sal precursora H ₂ PtCl ₆ .	Detección de ác. fórmico	[Zhu, 2008]
PANI/MWCNTs/SPAuE	Se sintetiza PANI/MWCNTs por oxidación química con persulfato amónico del anilina en presencia de MWCNTs en HCl. Finalmente se deposita el compósito PANI/MWCNTs sobre un electrodo de oro interdigitado.	Detección amperométrica de amoniaco en aire: IL: 0.2 - 15 ppm	[He, 2009]
P3OT/DWCNTs	Se sintetiza P3OT/DWCNTs por oxidación química con FeCl ₃ del monómero 3-octiltiofeno en presencia de DWCNTs en cloroformo.	Caracterización del material	[Koizhaiganova, 2009]

Tabla 2. Electrodoos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
FAD/PANI/MWCNTs/AuE (ó SPCE)	Se muelen MWCNTs con KOH. Después se depositan MWCNTs suspendidos en agua sobre el electrodo. Se prepara una disolución que contiene FAD y el monómero anilina en presencia de anión perclorato. A continuación se coinmoviliza el FAD durante la electropolimerización de PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.35 - 1.0 V) en medio ácido.	Determinación amperométrica en FIA de p-acetamidofenol ($E_{ap}=0.726$ V). Análisis de comprimidos: $m=3.3 \text{ mA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	[Li, 2009]
PPy/Tyr-SWCNTs/GCE	Se funcionalizan los SWCNTs con con ác. 1-pirenobutírico y se inmoviliza la enzima Tyr se inmoviliza covalentemente con EDC. Se sintetiza PPy/SWCNTs-Tyr por oxidación química con perclorato de litio del monómero pirrol en presencia de SWCNTs-Tyr. Finalmente la mezcla se deposita sobre un GCE.	Determinación amperométrica de dopamina ($E_{ap}=0.346$ V): IL: 5-50 μM LOD= 5 μM $m= 467 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	[Min, 2009]
PEDOT/MWCNTs/GCE (ó SPCE)	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en agua en presencia de monómero 3,4-etilendioxitiofeno. A continuación, sobre el electrodo se coinmovilizan los MWCNTs durante la electropolimerización galvanostática de PEDOT aplicando una corriente de oxidación de 0.014 mA durante 714 s.	Determinación potenciométrica de potasio: IL: 1 μM -0.1 M	[Mousavi, 2009]
NAD ⁺ /LDH-PTTCA/MWCNTs/AuE	Se prepara una suspensión de MWCNTs carboxilados en TBAP/CH ₂ Cl ₂ en presencia de monómero ácido 5,2'-5',2''-tertiofeno-3'-carboxílico. Sobre un AuE se coinmovilizan los MWCNTs durante la electropolimerización de PTTCA aplicando un barrido de potencial por CV (0.0 - 1.6 V). Después la enzima LDH se inmoviliza covalentemente con EDC y NHS. Finalmente sobre el biosensor LDH/PTTCA/MWCNTs/AuE se inmoviliza el NAD ⁺ por incubación.	Determinación amperométrica de lactato ($E_{ap} = 0.3$ V): IL: 5-90 μM LOD= 1 μM $m=0.0106 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	[Rahman, 2009]
PPy/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs carboxilados suspendidos en DMF sobre un GCE. Después se electropolimeriza PPy aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.0-0.8 V) (n=5) en una disolución de monómero pirrol y tiron.	Determinación de L-dopa por DPV: IL: 1 - 100 μM LOD=0.1 μM $m= 1.85 \mu\text{A}/\mu\text{M}$	[Shahrokhian, 2009]
PPy/SWCNTs	Se sintetiza PPy/SWCNTs por oxidación química con persulfato amónico del monómero pirrol en presencia de SWCNTs carboxilados en DBS. Finalmente la suspensión del compuesto en cloroformo/dodecibencenosulfonato se deposita sobre un electrodo interdigitado.	Determinación de amoniaco en aire: IL: 10 - 140 ppm y 140-800 ppm	[Van Hieu, 2009]
sDNA/PANI/MWCNTs/Chit/CPE	Se prepara una suspensión acuosa de MWCNTs carboxilados en presencia de nanofibras de PANI (sintetizadas previamente). A continuación se deposita el compuesto MWCNTs/PANI suspendido en chitosan sobre un CPE. Finalmente se sumerge el PANI/MWCNTs/Chit/CPE en una disolución de sDNA en SDS.	Detección secuencia específica de PAT y NOS: IL: 0.1 pM - 0.1 μM LOD: 0.027 pM	[Yang, 2009] _a
PANI/SWCNTs/PtE	Se sintetiza PANI por oxidación química con persulfato potásico del monómero anilina. A continuación se dispersa el polímero en una suspensión de SWCNTs en DMF. Finalmente se deposita el compuesto PANI/SWCNTs sobre un PtE.	Caracterización del material	[Zhou, 2009]
PCz (ó melanina ó PANI)/SWCNTs/ITO	Se depositan SWCNTs carboxilados suspendidos en DMF sobre un ITO. Después se electropolimeriza PCz, melanina o PANI aplicando un barrido de potencial mediante CV en una disolución del monómero correspondiente: carbazol (0.0-1.3 V) (n=10), dopamina (-0.5-1.0 V) (n=10) y anilina (-0.5-1.2 V) (n=10).	Caracterización de los materiales	[Ben-Valid, 2010]

Tabla 2. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y polímeros conductores electrónicos (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
anti-HCG/AuNPs/ PPA/MWCNTs/GCE	Se despositan MWCNTs carboxilados suspendidos en SDS sobre un GCE. Después se electropolimeriza PPA aplicando un barrido de potencial mediante CV (-0.8 - 0.8 V) (n=15) en una disolución de monómero 2,6-piridindiamina en presencia de anión nitrato. A continuación se introduce el electrodo PPA/MWCNTs/GCE en una suspensión de AuNPs. Finalmente se incuba en una disolución de anti-HCG y posteriormente en BSA.	Determinación de HCG por CV: IL: 1.0 - 10.0 y 10.0 - 160.0 mIU mL ⁻¹ LOD= 0.3 mIU mL ⁻¹ m ₁ =3.4745 μA mIU mL ⁻¹ y m ₂ =0.2478 μA mIU mL ⁻¹	[Wang, 2010]
anti-HBsAg-PPy/MWCNTs/GCE	Se depositan MWCNTs carboxilados suspendidos en DMF sobre un GCE. Después se electropolimeriza PPy aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.0 - 0.85 V) (n=30) en una disolución de monómero ácido pirrol propiónico. Finalmente el anticuerpo anti-HBsAg se inmoviliza covalentemente con EDC y NHS, y posteriormente se bloquea con suero humano. Se usa un formato tipo "sandwich".	Determinación de HBsAg por DPV: LOD: 0.01 ng/mL	[Hu, 2011]
GA-GOx/MWCNTs/AuNPs/PSNS- NH ₂ /CE	Se electropolimeriza PSNS-NH ₂ sobre un electrodo de grafito aplicando un barrido de potencial mediante CV (1.05 mC) (n=100) en una disolución de monómero 4-(2,5-di(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)bencenamina en presencia de anión perclorato. Después se depositan las AuNPs. A continuación se depositan MWCNTs suspendidos en etanol. Finalmente la GOx se inmoviliza sobre el MWCNTs/AuNPs/PSNS-NH ₂ /CE por entrecruzamiento con GA.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} = -0.7 V). Aplicación a bebidas: Int. lineal: 0.002-5.0 mM m=1.597 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	[Tuncagil, 2011]
PMG/MWCNTs/ GCE	Se despositan MWCNTs suspendidos en Nafion sobre un GCE. Después se electropolimeriza PMG aplicando un barrido de potencial mediante CV (0.0-1.2 V) (n=25) en una disolución de monómero verde de malaquita en H ₂ SO ₄ .	Detección simultánea de catecol (c) y quinol (q) por DPV: IL:0.03-1.19mM(c)y 0.01-0.48mM(q) LOD= 5.8 μAM (c) y 1.6 μM (q) m=0.4 mA mM ⁻¹ cm ⁻² (c) y 3.2 mA mM ⁻¹ cm ⁻² (q)	[Umasankar, 2011]

Abreviaturas utilizadas: AA: ácido ascórbico; AdsDPV: voltamperometría de redisolución adsorptiva en diferencial de impulsos; anf-pirrol: derivado de pirrol anfílico; AuE: electrodo de oro; AuNPs: nanopartículas de oro; BSA: albúmina de suero bovino; CE: electrodo de grafito; Chit: quitosán; ChOx: colesterol oxidasa; Citc c: citocromo c; COx: colina oxidasa; CPE: electrodo de pasta de carbono; CV: voltamperometría cíclica; DA: dopamina; DBS: dodecilsulfonato; DCF: dicofol; DMF: dimetilformamida; DNR: daunorubicina; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; DWCNTs: nanotubos de carbono de pared doble; EDAC: clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; FAD: flavin adenin dinucleotido; Fc-SWCNTs: nanotubos de carbono de pared sencilla funcionalizados con ferroceno; GA: glutaraldehído; GCE: electrodo de carbono vitrificado; GOx: glucosa oxidasa; HBsAg: antígeno de la Hepatitis B; HCG: gonadotropina coriónica humana; HRP: peroxidasa de rábano; IL: intervalo lineal; ISO: isoproturon; ITO: óxido de indio y estaño; LDH: lactato deshidrogenasa; LOD: límite de detección; LOx: lactato oxidasa; LSV: voltamperometría de barrido lineal de potencial; MG: verde de malaquita; MNPs: nanopartículas magnéticas; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleotido reducido; NHS: N-hidroxisuccinimida; NiHCF: ferricianuro de níquel; NOS: gen terminador de nopalina sintasa; P3MT: poli-(3-metil-tiofeno); P3OT: poli-(octil-tiofeno); PANI: poli-(anilina); PAT: gen fosfinotricin acetiltransferasa; PB: azul de prusia; PCz: poli-(carbazol); PDMA: poli-(dimetil-anilina); PEDOT: poli-(3,4-etilendioxitiofeno); PEO: óxido de poli-(etileno); PoPD: poli-(orto-fenilendiamina); PPA: poli-(2,6-piridindiamina); PPy: poli-(pirrol); PSNS-NH₂: poli-(4-(2,5-di(tiofeno-2-il)-1H-pirrol-1-il)bencenamina); PtE: electrodo de platino; PtNPs: nanopartículas de platino; PTTCA: ácido poli-(5,2'-5',2''-tertiofeno-3'-carboxílico); PVDF: fluoruro de polivinilideno; RuNPs: nanopartículas de rutenio; SDS: dodecilsulfato de sodio; SPAuE: electrodos serigrafados de oro; SPCE: electrodos serigrafados de carbono; SWCNTs: nanotubos de carbono de pared sencilla; TBAP: perclorato de tetrabutilamonio; Tyr: tirosinasa; UA: ácido úrico; VOL: voltaje.

2.3.2. PDDA Y NANOPARTÍCULAS

En los últimos años, la investigación relacionada con la preparación de materiales híbridos de nanotubos de carbono y nanopartículas, principalmente metálicas y de óxidos, ha despertado un gran interés debido a la ya comentada mejora de las características de los nanotubos de carbono que se produce en presencia de ambos materiales. La incorporación de las nanopartículas hace posible alcanzar una mayor estabilidad para las superficies biosensoras, ya que, como se ha demostrado, sobre todo en el caso de las nanopartículas de oro, las biomoléculas se inmovilizan en un ambiente parecido a su entorno natural. Pero, además, las nanopartículas ejercen un efecto electrocatalítico hacia algunos procesos electroquímicos en los que participan especies de interés bioquímico, y actúan como medio de conducción electrónica, facilitando, en el caso de las enzimas, la transferencia de electrones entre el centro redox de la proteína y la superficie electródica, lo que permite alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad [Luo, 2004].

Uno de los métodos más interesantes para la preparación de materiales híbridos de nanotubos de carbono y nanopartículas, es el basado en el “wrapping” con polielectrólitos, mediante el cual se forman complejos supramoleculares a través de interacciones no covalentes con la cadena carbonada de los nanotubos. El “wrapping” de nanotubos de carbono con polímeros hidrofílicos facilita la solubilización estable de aquéllos en disolución acuosa, preservándose sus propiedades intrínsecas, debido a la preferencia termodinámica de las interacciones CNT-polímero respecto de las interacciones CNT-agua, que hace que quede escondida la superficie hidrofóbica de los nanotubos de carbono y expuesta la superficie hidrofílica del polímero. Pero además, el empleo de polielectrólitos permite obtener una elevada densidad de sitios iónicos superficiales, constituyendo puntos de inicio para la adsorción uniforme de nanopartículas cargadas opuestamente, principalmente a través de interacciones atractivas electrostáticas [Correa-Duarte, 2006].

La metodología de recubrimiento de superficies cargadas con materiales con carga opuesta se denomina "Layer-by-layer" (LbL) (Figura 14), y se remonta a 1966, cuando Iler publicó por primera vez la fabricación de multicapas por deposición alterna de

partículas coloidales cargadas positiva y negativamente [Iler, 1966]. Este método supone una herramienta muy versátil en la fabricación de ensamblados moleculares complejos y estables, que permite ajustar de forma precisa distintos parámetros críticos de su composición y estructura, incrementando la capacidad de control sobre el funcionamiento final del sistema. Sus principales ventajas sobre otras metodologías, como las monocapas autoensambladas (SAM) o la técnica Langmuir-Blodgett, son: su gran simplicidad y bajo coste, la posibilidad de construir estructuras multicapa y su enorme flexibilidad, permitiendo recubrir sustratos de cualquier tamaño y forma [Zhang, 2007].

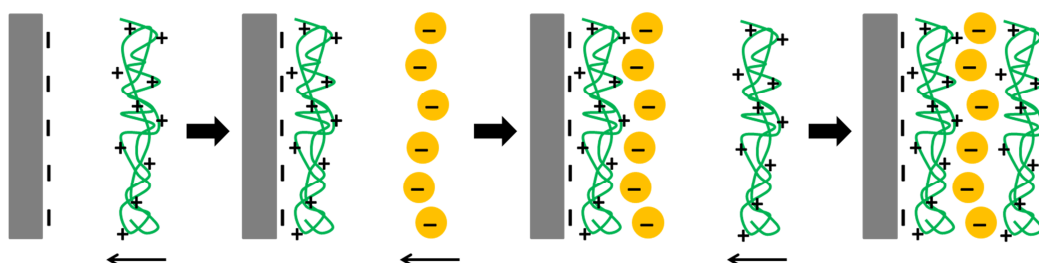


Figura 14. Esquema general de la metodología Layer by Layer (LbL).

Uno de los polielectrólitos más usados en estas estrategias, es el poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA). Se trata de un polímero catiónico soluble en agua que puede alcanzar pesos moleculares del orden de 2 a 3 millones, siendo su unidad monomérica una sal de amonio cuaternario con un peso molecular de 161.5 (Figura 15). El PDDA interactúa fuertemente con los nanotubos de carbono, mediante interacciones $\pi - \pi$ entre el polímero y el plano basal gráfico de los nanotubos de carbono [Yang, 2005].

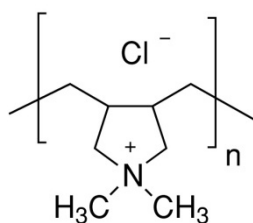


Figura 15. Unidad monomérica del PDDA.

Para ilustrar la utilidad del PDDA para la preparación de híbridos de nanotubos de carbono y nanopartículas, así como en su aplicación en electroanálisis, en la *Tabla 3* se han resumido las características de algunos electrodos modificados y biosensores electroquímicos basados en estos materiales que han sido descritos en la bibliografía. En dicha Tabla se indica brevemente el procedimiento utilizado para la fabricación de los electrodos en cada caso.

Tabla 3. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas.

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
{PtNPs/PDDA/MWCNTs} ₅ /MPS/AuE	Para la preparación de PtNPs, sobre 100 mL de una disolución acuosa de H ₂ PtCl ₆ 0.01% en ebullición, se adicionan 3 mL de citrato sódico 1% y se mantiene en las mismas condiciones durante 30 min. Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 100 mg de MWCNTs purificados en 500 mL de una disolución acuosa de PDDA 1mg/mL y NaCl 0.5 M con agitación US durante 3h. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación, se lava con agua y se resuspende el producto en agua con agitación US. Un AuE se sumerge en una disolución de MPS 4 mM durante 24 h, y a continuación se sumerge alternando, primero en una dispersión de PDDA/MWCNTs durante 30 min y a continuación en la disolución de PtNPs durante 30 min, repitiéndose cinco veces el proceso. Después de cada etapa el electrodo se lava con agua destilada y se seca con N ₂ .	Detección de oxígeno por CV.	[Wang, 2007] _a
PtNPs/CeO ₂ NPs/PDDA/MWCNTs/AuE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersa una cantidad de MWCNTs purificados en una disolución acuosa de PDDA 0.1 mg/mL con agitación US durante 1h. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación, se lava con agua y se seca a vacío a 100 °C. Para la preparación de CeO ₂ NPs/PDDA/MWCNTs sobre una mezcla que contiene PDDA/MWCNTs y Ce(NO ₃) ₃ se adiciona poco a poco una disolución de NH ₃ ·H ₂ O con agitación magnética, se lava con agua y se seca a 100 °C. Para la preparación de PtNPs se añade la cantidad adecuada de H ₂ PtCl ₆ ·6H ₂ O a 50 mL de EG-NaOH y se calienta en un horno MW durante 60s. Finalmente se mezcla cierta cantidad de CeO ₂ NPs/PDDA/MWCNT y de PtNPs y se mantiene en agitación durante 2h, se filtra, se lava y se seca a 105 °C. Sobre un AuE se deposita el producto PtNPs/CeO ₂ NPs/PDDA/MWCNTs suspendido en Nf-EG.	Detección de metanol por CV.	[Wang, 2007] _b
GA-{GOx-PtDENS} ₄ -PSS/PDDA/MWCNTs/PtE	Para la preparación de PtDENSs se adiciona un volumen de una disolución acuosa de K ₂ PtCl ₆ 0.1 M a una disolución de dendrímeros G4-OH 50 μM y se agita durante 48 h. A continuación se añade un exceso de NaBH ₄ 0.5M, se deja reaccionar durante 5h y la disolución de PtDENSs se dializa para eliminar las impurezas. Se dispersa una cantidad de MWCNTs en una disolución acuosa de PDDA durante 10 min y a continuación en una disolución acuosa de PSS durante 10 min. Seguidamente se dispersa alternando, primero en la disolución de PtDENSs durante 10 min, y a continuación en una disolución de GOx durante 10 min, repitiéndose 4 veces el proceso. Después de cada etapa el material se centrifuga y se lava con agua. Sobre un PtE se depositan 10 μL de la dispersión de {GOx-PtDENS} ₄ -PSS/PDDA/MWCNTs y se deja secar a 4 °C. Finalmente el electrodo se sumerge en GA 5% durante 30 min.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} = 0.0 V):IL: 0.005-0.65 mM; m=30.64 μA mM ⁻¹ cm ⁻² ; LOD=2.5 μM; t _{resp} = 5s; K _M =8.9 mM; Reproducibilidad: RSD=4.1%; Estab. operacional: 1 mes a 4 °C (80%).	[Xu, 2007]
Nf/PtNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 100 mg de MWCNTs purificados en 400 mL de una disolución acuosa de PDDA 0.5% y NaCl 0.5 M con agitación US. A continuación se elimina el PDDA en exceso por filtración, se lava con agua y se seca a vacío a 70 °C durante 24 h. Para la preparación de PtNPs/PDDA/MWCNTs se dispersan 30 mg de PDDA/MWCNTs en una disolución de H ₂ PtCl ₆ , preparada en EG, con agitación US, ajustándose el pH a 12.5 y posteriormente se somete a reflujo a 130 °C durante 3 h y se ajusta el pH a pH 3-4. A continuación se filtra el producto, se lava con agua y se seca a vacío a 70 °C durante 24 h. Sobre un GCE se depositan 30 μL de la dispersión de PtNPs/PDDA/MWCNTs 1 mg/mL, preparada en EtOH, y, finalmente, se deposita 1 μL de Nafion 0.5%.	Detección de metanol por CV.	[Wang, 2008] _b

Tabla 3. Electrodo modificado con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
{PtNPs/MWCNTs/PDDA} ₇ /GCE	Para la preparación de PtNPs/MWCNTs se dispersa una cantidad de MWCNTs purificados en 15 mL de una disolución de K ₂ PtCl ₆ , preparada en EG:agua (2:1), y posteriormente se somete a reflujo a 125 °C durante 2h. A continuación se centrifuga el producto y se lava con agua. Un GCE se sumerge alternando, primero en una disolución acuosa de PDDA 1% y NaCl 0.5M durante 30 min, y a continuación en una dispersión de PtNPs/MWCNTs 1mg/mL durante 1h, repitiéndose siete veces el proceso. Después de cada etapa el electrodo se lava con agua y se seca con N ₂ .	Detección de metanol por CV.	[Yuan, 2008]
Nf/PtNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 100 mg de MWCNTs en una disolución acuosa de PDDA 0.5% y NaCl 0.5 M con agitación US durante 1h y se mantiene en agitación durante toda la noche. A continuación se elimina el PDDA en exceso por filtración, se lava y se seca a vacío a 70 °C durante 24 h. Para la preparación de PtNPs/PDDA/MWCNTs se dispersan 30 mg de PDDA/MWCNTs en una disolución de H ₂ PtCl ₆ , preparada en EG, con agitación US, ajustándose a continuación el pH a 12.5 y posteriormente se somete a reflujo a 130 °C durante 3 h (o en un horno MW durante 120s) y se ajusta el pH a 3-4. El producto se filtra, se lava con agua y se seca a vacío a 70 °C durante 24 h. A continuación se resuspende en 50 mL de agua con agitación US durante 30 min, se adiciona una mezcla de AA:H ₂ PtCl ₆ (5:1) y se calienta a ebullición durante 30 min. El producto PtNPs/PDDA/MWCNTs se filtra y se seca a vacío a 70 °C durante toda la noche. Sobre un GCE se depositan 20 µL de la dispersión PtNPs/PDDA/MWCNTs 2 mg/mL, preparada en EtOH y, finalmente, se deposita 1 µL de Nafion 0.5%.	Detección de oxígeno por LSV sobre electrodo rotatorio. Detección de metanol por CV.	[Wang, 2009] _a
Nf/PB@PtNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PtNPs sobre 100 mL de una disolución acuosa de H ₂ PtCl ₆ 0.3 mM en ebullición se adicionan 1.5 mL de citrato sódico 0.1 M y se mantiene en las mismas condiciones hasta obtenerse una disolución de color marrón, se ajusta a pH 7 y se almacena a 4 °C. Para la preparación de PB@PtNPs se adicionan 10 mL de una disolución de FeCl ₃ 1 mM, K ₃ Fe(CN) ₆ 1mM, KCl 0.1 M y HCl 0.025 M en 10 mL de una suspensión de PtNPs con agitación durante 2 h. A continuación la disolución verde resultante se centrifuga, se lava, y el precipitado se resuspende en 10 mL de agua. Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 5 mg de MWCNTs purificados en 10 mL de una disolución acuosa de PDDA 1% con agitación US, y se incuba a 50 °C durante toda la noche. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación y el producto se resuspende en 10 mL de agua. Finalmente, se mezcla 1 mL de la suspensión de PDDA/MWCNTs y 2 mL de la suspensión de PB@PtNPs, se agita durante 2h, se centrifuga y se resuspende en 1 mL de agua. Sobre un GCE se depositan 10 µL de la dispersión de PB@PtNPs/PDDA/MWCNTs y se deja secar a T amb. Finalmente se depositan 10 µL de Nafion 0.1%.	Determinación amperométrica de peróxido de hidrógeno (E _{ap} = 0.1 V): IL: 2.5 x10 ⁻⁴ -1.5 mM; m=0.85 A M ⁻¹ cm ⁻² ; LOD=1.5x10 ⁻⁴ mM; t _{resp} < 2s; Reproducibilidad: RSD=7.36% ; Estab. operacional: 1 mes (>60%); Estab. almacenamiento: 1 mes a 4 °C en KCl 0.1M de pH 2 (92%) y 1 mes a 4 °C en seco (95%).	[Zhang, 2009]
PtNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Se dispersan 0.2 mg de MWCNTs purificados en 100 µL de una disolución acuosa de PDDA 0.5% y se agita durante 30 min a T amb. Sobre un GCE se depositan 10 µL de la dispersión MWCNTs/PDDA y se deja secar a T amb. durante 30 min. A continuación el electrodo PDDA/MWCNTs/GCE se sumerge en una disolución acuosa de PtCl ₆ ²⁻ 0.25% durante 5 min con agitación y posteriormente se lava con agua. Finalmente el electrodo se sumerge en una disolución acuosa de NaBH ₄ 0.08% durante 30 min con agitación.	Determinación de hidrazina: a) LSV: IL: 0.2-2 mM;m=19.5µA mM ⁻¹ b) amperometría: (E _{ap} =-0.35V): IL: 25-150 µM; m=0.109 µA µM ⁻¹ ; LOD=0.5 nM.	[Chakaborty, 2010] _a

Tabla 3. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
PtNPs/PDDA/ MWCNT/GCE	Se dispersan 300 mg de MWCNTs en una disolución acuosa de PDDA 0.5% con agitación US durante 3h y se mantiene en agitación durante 24 h. A continuación se adicionan 2.5 g de KNO ₃ , se filtra y el producto PDDA/MWCNT se seca a vacío a 90 °C durante 3 h. Para la preparación de PtNPs/PDDA/MWCNTs se adicionan 2.656 mL de H ₂ PtCl ₆ (38.6 mM) en 60 mL de EG y se agita durante 10 min, ajustándose a continuación el pH a 12. Seguidamente se adicionan 80 mg de PDDA/MWCNTs, se mantiene en agitación durante 1 h y se calienta a reflujo a 130 °C durante 4 h. Finalmente se ajusta la suspensión a pH<2 con HNO ₃ , se lava con agua y se seca a vacío a 90 °C durante toda la noche. Sobre un GCE se depositan 7.5 µL de PtNPs/PDDA/MWCNTs 2 mg/mL, preparada en EtOH, y se deja secar a T amb. Por último se depositan 2 x 5 µL de Nafion 0.05%.	Detección de oxígeno por LSV sobre electrodo rotatorio.	[Zhang, 2011]
Nf/PtNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE Nf/PdNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 100 mg de MWCNTs en 400 mL de una disolución de PDDA 0.5% y NaCl 1% con agitación US. A continuación se elimina el PDDA en exceso por filtración, se lava y se seca a vacío a 70 °C durante 24h. Para la preparación de PtNPs/PDDA/MWCNTs se dispersan 30 mg de PDDA/MWCNTs en una disolución de H ₂ PtCl ₆ , preparada en EG, con agitación US, ajustándose a continuación el pH a 12.5, y posteriormente se calienta en un horno MW durante 120s. El producto se filtra, se lava y se seca a vacío a 70 °C durante 24h. A continuación se resuspende en 50 mL de agua con agitación US durante 30 min, se adiciona una mezcla de AA:H ₂ PtCl ₆ (5:1) y se calienta a ebullición durante 30 min. El producto PtNPs/PDDA/MWCNTs se filtra y se seca a vacío a 70 °C durante toda la noche. Sobre un GCE se depositan 20 µL de una suspensión de PtNPs/PDDA/MWCNTs 2 mg/mL y, finalmente, se deposita 1 µL de Nafion. Para la preparación de PdNPs/PDDA/MWCNTs se mezclan 5 mL de NaBH ₄ 10 mM con 180 mL de una disolución que contiene K ₂ PdCl ₄ 0.25 mM y citrato sódico 0.25mM hasta la formación de PdNPs. A continuación se dispersan 11 mg de PDDA/MWCNTs en la disolución anterior con agitación US durante 30 min y se deja agitando durante toda la noche. El producto se resuspende en 50 mL de agua con agitación US durante 30 min, se adiciona una mezcla de AA:K ₂ PdCl ₄ (5:1) y se mantiene a T amb. durante 30 min. El producto PdNPs/PDDA/MWCNTs se filtra y se seca a vacío a 70 °C durante toda la noche. Sobre un GCE se depositan 20 µL de una suspensión de PdNPs/PDDA/MWCNTs 2 mg/mL y, finalmente, se deposita 1 µL de Nafion	Detección de metanol y ácido fórmico por CV.	[Wang, 2010] _a
PdNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE	Se dispersan 0.2 mg de MWCNTs purificados en 100 µL de una disolución acuosa de PDDA 0.5% y se agita durante 30 min a T amb. Sobre un GCE se sepositan 10 µL de la dispersión MWCNTs/PDDA y se deja secar a T amb. durante 30 min. A continuación el electrodo se sumerge en una disolución acuosa de PdCl ₄ ²⁻ 0.25% durante 5 min con agitación y posteriormente se lava con agua. Finalmente el electrodo se sumerge en una disolución acuosa de NaBH ₄ 0.08% durante 30 min con agitación.	Detección de ácido fórmico y oxígeno por CV.	[Chakaborty, 2010] _b

Tabla 3. Electrodoos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
Nf/HPdNEs-PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 5 mg de MWCNTs purificados en 250 mL de una disolución acuosa de PDDA 0.5% y NaCl 0.5 M con agitación US durante 6 h. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación y se lava. Para la preparación de HPdNEs se disuelven 0.01 g de ácido cítrico y 0.015 g de NaBH ₄ en 50 mL de agua y se adicionan 50 μL de CoCl ₂ 0.4 M. A continuación, la disolución negra obtenida se mezcla con una disolución de H ₂ PdCl ₂ 56.4 mM, se agita a T amb. y se centrifuga. Para la preparación de HPdNEs-PDDA/MWCNTs se mezclan 2 mL de la suspensión de PDDA/MWCNTs y 8 mL de la disolución de HPdNEs durante 20 min con agitación US, se agita durante toda la noche, centrifuga y se concentra. Sobre un GCE se deposita la cantidad adecuada del producto HPdNEs-PDDA/MWCNTs y se deja secar a T amb. Finalmente se depositan 10 μL de Nafion 0.05% y se seca bajo una lámpara de radiación IR.	Detección de metanol, etanol y ácido fórmico por CV.	[Liu, 2010]
PdNPs/HPW/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 300 mg de MWCNTs en 20 mL de una disolución acuosa de PDDA con agitación US y se agita durante toda la noche. A continuación se elimina el PDDA en exceso por filtración, se lava y se seca a 60 °C. Seguidamente se dispersan en una disolución acuosa de HPW 4.8 mg/mL, se filtran, se lava y se seca a 60 °C. Para la preparación de PdNPs/HPW/PDDA/MWCNTs se dispersan 80 mg de HPW-PDDA/MWCNTs en 9.4 mL de PdCl ₂ con agitación US, se evapora el disolvente y se secan primero a 60 °C y posteriormente a 150 °C durante 2h. Sobre un GCE se deposita la cantidad adecuada del producto PdNPs/HPW/PDDA/MWCNTs.	Detección de oxígeno por LSV sobre electrodo rotatorio.	[Wang, 2010].
Nf/AgNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 50 mg de MWCNTs en 250 mL de una disolución acuosa de PDDA 0.5% con agitación US durante 6 h. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación y se lava. Para la preparación de AgNPs se mezclan 200 μL de AgNO ₃ 0.1 M y 630 μL de citrato sódico 0.1 M, y se diluye hasta 19.6 mL, seguido de la adición de 0.4 mL de NaBH ₄ 0.1 M, dejando reaccionar durante 24 h. Seguidamente 1 mL de la suspensión de PDDA/MWCNTs se mezcla con 1.8 mL de la disolución de AgNPs con agitación US durante 2 h, se centrifuga, se lava y se preconcentra. Sobre un GCE se depositan 25 μL de AgNPs/PDDA/MWCNTs y se deja secar a T amb. Finalmente se depositan 10 μL de Nafion 0.05%.	Determinación amperométrica de peróxido de hidrógeno (E _{ap} =-0.45 V): LOD: 0.05-9 mM; LOD=1.6 μM; t _{resp} =3s; Repetibilidad: RSD<5% .	[Shi, 2011]
GOx/PDDA/MWCNTs/PDDA/AuNPs/Cyst/AuE	Para la preparación de AuNPs se adiciona citrato sódico a una disolución de HAuCl ₄ en ebullición, y se mantiene así hasta que la disolución alcanza un color rojizo, dejándose posteriormente enfriar a T amb. Un AuE se sumerge en una disolución de Cyst 0.1 M durante 5h a 4 °C, y se lava con agua. A continuación se depositan 12 μL de AuNPs, se seca a 4 °C y se lava con agua. Seguidamente el electrodo se sumerge en una disolución de PDDA 1% y NaCl 0.5M durante 30 min y, después de lavar, se depositan 6 μL de MWCNT 1 mg/mL y se deja secar a T amb. Finalmente el electrodo MWCNTs/PDDA/AuNPs/Cyst/AuE se vuelve a sumergir en una disolución de PDDA 1% y NaCl 0.5M durante 30 min, se lava con agua y se deposita 1 μL de GOx (6 mg/mL), dejando secar a 4 °C.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} = -0.2 V): IL: 0.5-9 mM; m=7.3 μA mM ⁻¹ cm ⁻² ; LOD=128 μM; t _{resp} = 10s; K _M =10.5 mM; Repetibilidad: RSD=1.5%; Reproducibilidad: RSD=4.6%; Estab. operacional: 3 semanas a 4 °C (83%).	[Liu, 2007].

Tabla 3. Electrodos modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
{AuNPs/PDDA/MWCNTs} ₃ /GCE	Para la preparación de AuNPs se adiciona citrato sódico a una disolución de HAuCl ₄ en ebullición, y se mantiene así hasta que la disolución alcanza un color rojizo, dejando posteriormente enfriar a T amb. Se dispersa 1 mg de MWCNTs purificados en una disolución acuosa de PDDA 1 mg/mL y NaCl 0.5 M y se agita con US durante 3 h. Un GCE se sumerge alternando, primero en la dispersión de PDDA/MWCNTs durante 30 min a T amb, y a continuación en una disolución de AuNPs durante 30 min, repitiéndose tres veces el proceso. Después de cada etapa el electrodo se lava y se seca en atmósfera de Ar.	Detección de oxígeno por LSV sobre electrodo rotatorio.	[Alexeyeva, 2008]
Anti-HlgG/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de AuNPs se adiciona citrato sódico a una disolución de HAuCl ₄ en ebullición, y se mantiene así hasta que la disolución alcanza un color rojizo, dejándose posteriormente enfriar a T amb. Para la preparación de PDDA/MWCNTs se dispersan 100 mg de MWCNTs purificados en 200 mL de una disolución acuosa de PDDA 0.25% y NaCl 0.5 M con agitación US durante 30 min. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación y se lava. Sobre un GCE se depositan 5 µL de PDDA/MWCNTs 5 mg/mL y se deja secar a T amb. A continuación se sumerge en una disolución de AuNPs durante 30 min, se lava con agua, se depositan 5 µL de anti-HlgG 0.5 mg/mL y se incuba a 4 °C durante 15h. Finalmente el electrodo se bloquea con BSA 2%-Tween 0.05% durante 1 h a T amb. y se lava con PBS-Tween.	Determinación de HlgG por DPV: IL: 0.125-80 ng mL ⁻¹ ; m=18.18 µA ng mL ⁻¹ ; LOD=40 pg mL ⁻¹ ; Repetibilidad: RSD=6.5%; Estabilidad operacional: 30 días a 4 °C (95%). Aplicación a muestras de suero.	[Cui, 2008]
GOx-AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	Para la preparación de AuNPs se adiciona citrato sódico 1% a una disolución de HAuCl ₄ 0.01 % en ebullición y se mantiene otros 30 min más cuando la disolución alcanza un color rojizo, se deja posteriormente enfriar a T amb. y se diluye la mezcla hasta 100 mL con agua destilada. Se dispersan 2 mg de MWCNTs purificados en 0.5 mL de una disolución acuosa de PDDA 1% y se agita con US. A continuación, sobre la dispersión de MWCNTs/PDDA se adicionan 0.5 mL de la disolución de AuNPs y se agita durante 1h, adicionándose posteriormente 10 mg de GOx . Finalmente sobre un GCE se depositan 5 µL de la mezcla GOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs y se deja secar a T amb.	Determinación amperométrica de glucosa (E _{ap} =-0.3 V): IL: 0.5-5.2 mM; m=3.96 mA M ⁻¹ cm ⁻² ; K _M =1.76 mM; Reproducibilidad: RSD=7.1%; Estab. almacenamiento: 1 semana a 4 °C (97%).	[Yao, 2008]
Anti-HlgG/AuNPs/PDDA/CNEs/GCE	Para la preparación de CNEs se calienta una disolución acuosa de glucosa 0.125 g/mL en un horno MW a 170 °C durante 20 min, se centrifuga y se lava. Las CNEs se dispersan en una disolución acuosa de PDDA 0.25% y NaCl 20 mM con agitación durante 20 min. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación y el complejo obtenido PDDA/CNEs se lava y se seca. Seguidamente se redispersan 0.12 g de PDDA/CNEs en 100 mL de AuNPs con agitación durante 10 min, se lava y se redispersa en PBS. Sobre un GCE se depositan 4 µL de AuNPs/PDDA/CNEs 5 mg/mL y se seca en un desecador. A continuación se depositan 5 µL de anti-HlgG 0.5 mg/mL y se incuba a 4 °C durante 15h. Finalmente el electrodo se bloquea con BSA 2%-Tween 0.05% durante 1 h a T amb. y se lava con PBS-Tween.	Determinación de HlgG por DPV: IL: 5-250 ng mL ⁻¹ ; m=5.19 µA ng mL ⁻¹ LOD=1.8 ng mL ⁻¹ ; Repetibilidad: RSD=9.6% ; Reproducibilidad: RSD=9.8%. Aplicación a una muestra de suero.	[Cui, 2010]

Tabla 3. Electrodo modificado con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
Anti-AFP/AuNPs/ Thi/DNA/PDDA/ MWCNTs/Au/ GCE	Se dispersa 1 mg de MWCNTs purificados en 1 mL de una disolución acuosa de PDDA 1 mg/mL y NaCl 0.5 M y se agita con US durante 3 h. Un GCE se sumerge en una disolución de H ₂ AuCl ₄ 2 mg/mL y se aplica un potencial de -0.2 V durante 30s. A continuación se despositan 15 µL de la dispersión PDDA/MWCNTs y se deja secar a T amb. Seguidamente se depositan 10 µL de DNA 1 mg/mL y se incuba a 4 °C durante 4h. El electrodo se sumerge entonces en una disolución de Thi 3mM durante 2h y posteriormente se depositan 10 µL de la disolución de AuNPs y se deja secar a 4 °C. Finalmente el electrodo se sumerge en una disolución de anti-AFP a 4 °C durante 12h y se incuba en BSA a T amb. durante 40 min.	Determinación de alfa-fetoproteína por DPV: IL: 0.1-10 ng mL ⁻¹ y 10-200 ng mL ⁻¹ ; m ₁ =2.59 µA ng mL ⁻¹ y m ₂ =0.08 µA ng mL ⁻¹ ; LOD=0.04 ng mL ⁻¹ ; Repetibilidad: RSD=3.2% ; Reproducibilidad: RSD=4.7% ; Estab. operacional: 100 ciclos (91.3%); Estab. almacenamiento: 1 mes a 4 °C en PBS (79%). Aplicación a muestras patrón con recuperaciones de 96.5-103%.	[Ran, 2010]
PDDA/COx/ AuNPs/Cyst- MWCNTs/PtE	Se dispersa una cantidad de MWCNTs purificados en una mezcla de EDC 50 mg/mL y NHS 50 mg/mL durante 1h, se centrifuga y se lava. Seguidamente se dispersan en Cyst durante 1h, se centrifuga y se lava. A continuación se dispersan en una disolución de AuNPs durante 1h, se centrifuga, se lava y se seca. Finalmente se dispersa 1 mg de AuNPs/Cyst-MWCNTs con 30 µL de COx 10 mg/mL y con 100 µL de PDDA 1% con agitación US durante 5 min. Sobre un PtE se depositan 6 µL del material COx/AuNPs/Cyst-MWCNTs y se deja secar a T amb durante 1h.	Determinación amperométrica de colina (E _{ap} = 0.35 V): IL: 0.001-0.5 mM; m=12.97 µA mM ⁻¹ ; LOD=0.3 µM; t _{resp} = 7s; K _M =0.42 mM; Repetibilidad: RSD=3.7% ; Reproducibilidad: RSD=6.2%; Estab. almacenam.. 1 mes a 4 °C en seco (82.5%).	[Qin, 2010]
AuNPs/{MWCNT s/PSS/PDDA} ₃ /PS S/PEI/ITO	Se dispersan 5 mg de MWCNTs en 10 mL de una disolución acuosa de PSS 10 mg/mL con agitación US durante 4h. A continuación se elimina el PSS en exceso por centrifugación y se. Sobre un ITO se deposita un volumen de una disolución de PEI 1 mg/mL y NaCl 0.5M durante 15 min. Seguidamente se deposita PSS en las mismas condiciones. A continuación se deposita alternando, primero una disolución acuosa de PDDA 1mg/mL y NaCl 0.5M durante 15 min y a continuación de MWCNTs/PSS 0.5 mg/mL durante 15 min, repitiéndose tres veces el proceso. Finalmente el electrodo se sumerge en una disolución de AuNPs durante 1h. Después de cada etapa el electrodo se lava con agua y se seca con N ₂ .	Detección de óxido nítrico por CV.	[Yu, 2011]

Tabla 3. Electrodo modificados con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
Anti-HlgG/ AuNPs/PDDA/ CdSeQD/PAH/ MWCNTs/AuE	Para la preparación de CdSeQD se mezclan 20 mL de una disolución de CdCl ₂ 5mM y 20 µL de TGA , se ajusta a pH 10, se diluye a 50 mL y se burbujea con N ₂ durante 30 min, y a continuación se adicionan 0.5 mL de Na ₂ SeSO ₃ 0.1M, obteniéndose una disolución amarillenta de CdSeQD. Se dispersan 50 mg de MWCNTs en una disolución de PAH 0.5% y NaCl 0.5M con agitación US durante 3h, se agita a 80 °C durante toda la noche y se vuelve a agitar en US durante 2h, eliminándose el exceso de polímero por centrifugación. Para la preparación del material MWCNTs/PAH-CdSeQD se mezclan 3 mL de la disolución de CdSeQD y 2 mL de PAH/MWCNTs con afitación US durante 15 min, eliminándose el exceso de partículas por centrifugación. Sobre un AuE se depositan 10 µL de CdSeQD/PAH/MWCNTs y se deja secar a T amb. A continuación se depositan 10 µL de una disolución de PDDA 0.5% y NaCl 0.5M, se deja secar 2h y se sumerge en una disolución de AuNPs durante 8h. Seguidamente el electrodo se lava y se sumerge en una disolución de anti-HlgG 0.5 mg/mL durante 12 h a 4 °C. Finalmente se depositan 20 µL de BSA 2% a 37 °C durante 1h.	Determinación de HlgG por DPV: IL: 0.002-500 ng mL ⁻¹ ; m=2024.7 a.u. ng mL ⁻¹ ; LOD=0.6 µg mL ⁻¹ ; Repetibilidad: RSD=9.8%; Reproducibilidad: RSD=8.3% ; Estab. operacional: 30 días en PBS a 4 °C. Aplicación a una muestra de suero.	[Jie, 2009]
GA-BSA/{GDH/ CdSQD/PDDA} ₃ / MWCNTs/ITO	Para la preparación de CdSQD/PDDA se mezcla una disolución acuosa de Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 0.05M con PSS (1 mg/mL) y posteriormente con PDDA (1 mg/mL) y se calienta durante 4 h. A continuación se adiciona lentamente una disolución de tioacetamida 5 mM y después de 90 min, cuando la disolución es amarillenta, se enfria a T amb. Para la preparación de MWCNTs/(CdSQD/GDH) ₃ se dispersan los MWCNTs purificados alternando, primero con CdSQD/PDDA y a continuación con GDH, repitiéndose tres veces el proceso. Finalmente, sobre un ITO se deposita un volumen de 10 mL de una suspensión que contiene el híbrido MCNTs/(CdSQD/GDH) ₃ , BSA 1mg/mL y glutaraldehido 5%.	Determinación amperométrica de glutamato (E _{ap} =0.2 V): IL: 0.1-25 µM; m=11.9 nA µM ⁻¹ ; LOD=50 nM; t _{resp} =5s; Repetibilidad: RSD=5% ; Estab. almacenamiento: 20 días a 4 °C (95%).	[Tang, 2008]
GA- Tyr/Fe ₃ O ₄ NPs/PD DA/PSS/ MWCNTs/GCE	Para la preparación de Fe ₃ O ₄ NPs se disuelven 2 g de acetato sódico, 7 g de 1,6-diaminhexano y 1 g de FeCl ₃ ·6H ₂ O en 30 mL de glicol, se agita a 50 °C y posteriormente se hace reaccionar a 200 °C durante 6 h, se lavan con agua y etanol, y se resuspenden en 250 mL de PBS. A continuación 15 mg de MWCNTs purificados se dispersan en 100 mL de PSS 1% con agitación US y se elimina el PSS en exceso por centrifugación. Seguidamente se redisperdan en 100 mL de una disolución acuosa de PDDA 1% y NaCl 0.5M con agitación US durante 30 min, se elimina el PDDA en exceso y se resuspende en 100 mL NaCl 0.2M.. Finalmente el material PDDA/PSS/MWCNTs se mezcla con las Fe ₃ O ₄ NPs ajustando el pH a 11-12, con agitación US durante 1h, se centrifuga, se lava y se resuspende en 10 mL de agua con agitación US. Sobre un GCE se depositan 10 µL de Fe ₃ O ₄ NPs/PDDA/PSS/MWCNTs y se seca a 50 °C durante 2h. Finalmente se depositan 5µL de Tyr 5 mg/mL y 5 µL de GA 0.5%, y se deja secar durante 2h.	Determinación amperométrica de fenol (E _{ap} = -0.2 V): IL: 0.01-39 µM; LOD=5 nM; t _{resp} = 5s; K _M =58.6 µM; Repetibilidad: RSD=3.1%; Reproducibilidad: RSD=4.7% ; Estab. operacional: 1 mes (89%) y 2 meses (71%). Detección amperométricas en FIA de E.coli (E _{ap} = -0.2 V): IL: 20-1x10 ⁵ cfu mL ⁻¹ ; LOD=10 cfu mL ⁻¹ .	[Cheng, 2009]
DNA/PDDA/ Fe@Fe ₂ O ₃ NPs/M WCNTs/PDDA/ GCE	Para la preparación de Fe@Fe ₂ O ₃ NPs se disuelven 0.15 g de FeCl ₃ ·6H ₂ O en 50 mL de agua y posteriormente se adiciona 20 mL de NaBH ₄ con una velocidad de 0.5 mL/s, se lava con agua y etanol y se seca con N ₂ . Para la preparación de Fe@Fe ₂ O ₃ NPs/MWCNTs se mezclan ambos componentes en una relación 10:30 (v/v). Sobre un GCE se deposita sucesivamente: PDDA 2 mg/mL , Fe@Fe ₂ O ₃ NPs/MWCNTs 1.5 g/L, PDDA 2 mg/mL y DNA 2 mg/mL, todas ellas con un volumen de 8 µL.	Determinación de ADN por DPV: LOD=0.16 µg; Reproducibilidad: RES=3.45%; Estab. Operacional: 11 ciclos (90%); Estab. almacenamiento: 15 días a T amb. (95%).	[Wang, 2010] _b

Tabla 3. Electrodo modificado con materiales híbridos de nanotubos de carbono y PDDA con nanopartículas (cont.).

Electrodo	Preparación	Aplicación	Referencia
{PB@PDDANPs/MWCNTs} ₅ /PDDA/PSS/Cyst/AuE	Para la preparación de PB@PDDANPs se adicionan 4 mL de K ₃ [Fe(CN) ₆] 25 mM a una disolución que contiene 16 mL de FeCl ₂ ·4H ₂ O 6.25 mM y PDDA 12.5 M con agitación vigorosa a T amb. A continuación se elimina el PDDA en exceso por centrifugación, se lava y se resuspende el complejo en 5 mL de agua con agitación US. Un AuE se sumerge primero en una disolución de Cyst 1 mM durante 1h, a continuación en una disolución de PSS 3 mg/mL durante 20 min y seguidamente en una disolución de PDDA 3mg/mL durante otros 20 min. Finalmente el electrodo se sumerge alternando, primero en una dispersión de MWCNTs 0.2 mg/mL durante 20 min y a continuación en una disolución de PB@PDDANPs durante otros 20 min, repitiéndose cinco veces el proceso. Durante cada etapa el electrodo se lava con agua destilada y se seca con N ₂ .	Detección de peróxido de hidrógeno por CV.	[Wang, 2008] _a
PDDA/GOx/ZnONPs/MWCNTs/PGE	Sobre un GCE se deposita una cantidad de MWCNTs y se evapora el disolvente con N ₂ . A continuación, sobre el electrodo se depositan las ZnONPs siguiendo un mecanismo de vaporización sólida autocatalizada, a 750 °C durante 15-30 min, a partir de una mezcla de grafito, ZnO y Zn. A continuación se depositan 4 µL de GOx 30 mg/mL y se deja secar a T amb. Finalmente se depositan 4 µL de PDDA 0.5%.	Detección amperométrica de glucosa (E _{ap} = -0.1 V): IL: 0.02-6 mM; m=50.2 mA M ⁻¹ cm ⁻² ; LOD=250 nM; t _{resp} = 6s; K _M =8.9 mM; Estab. operacional: 160 días a 4 °C (90%). Aplicación a una muestra de suero.	[Wang, 2009] _b

Abreviaturas utilizadas: AA: ácido ascórbico; AgNPs: nanopartículas de plata; anti-AFP: anti-alfa-fetoproteína; AuE: electrodo de oro; AuNPs: nanopartículas de oro; BSA: albúmina de suero bovino; CNEs: nanoesferas de carbono; COx: colina oxidasa; CV: voltamperometría cíclica; Cyst: cisteamina; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; EG: etilenglicol; Fe@Fe₂O₃NPs: nanopartículas de hematita/hierro; Fe₃O₄NPs: nanopartículas de magnetita; GA: glutaraldehído; GCE: electrodo de carbono vitrificado; GDH: glutamato deshidrogenasa; GOx: glucosa oxidasa; HlgG: inmunoglobulina G humana; HPdNEs: nanoesferas huevas de paladio; HPW: ácido tungstosfórico; IL: intervalo lineal; ITO: óxido de indio y estaño; K_M: constante de Michaelis-Menten; LOD: límite de detección; LSV: voltamperometría de barrido lineal de potencial; MPS: ácido 3-mercaptopropil-1-propano-sulfónico, sal sódica; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple; Nf: nafion; NHS: N-hidroxisuccinimida; PAH: poli-(hidrocloruro de alilamina); PB: azul de prusia; PDDA: poli-(cloruro de dialildimetilamonio); PdNPs: nanopartículas de paladio; PEI: poli-(etilenimina); PGE: electrodo de grafito pirolítico; PSS: poli (4-estireno sulfonato); PtDENs: dendrímeros de nanopartículas de platino; PtE: electrodo de platino; PtNPs: nanopartículas de platino; QD: quantum dots; Thi: tionina; Tyr: tirosinasa; ZnONPs: nanopartículas de óxido de zinc.

Como puede apreciarse, la funcionalización de los nanotubos de carbono con PDDA requiere, en la mayoría de los casos, del empleo de NaCl. Esto es debido a que el aumento de la fuerza iónica del medio que se consigue, hace que los contraiones apantallen parcialmente las cargas iguales de las cadenas del polímero, permitiendo que adopten una configuración al azar que conduce a capas más gruesas de polímero, con una mayor densidad de cargas positivas sobre la pared de los nanotubos de carbono [Correa-Duarte, 2004]. Con este fin también se han empleado otras sales como el nitrato de potasio [Zhang, 2011].

En estas configuraciones la presencia de PDDA hace posible inmovilizar nanopartículas metálicas de distinta naturaleza de forma uniforme sobre los nanotubos de carbono, con el objetivo de construir electrodos modificados para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, se han preparado híbridos con nanopartículas de platino (PtNPs) cuyo un efecto electrocatalítico hacia la oxidación de metanol [Wang, 2008]_b y hacia la reducción del oxígeno [Zhang, 2011] es más intenso que el que poseen híbridos preparados sobre nanotubos carboxilados. Este hecho se ha atribuido, por un lado, a que sobre los nanotubos carboxilados, la inmovilización de nanopartículas tiene lugar sobre los defectos superficiales generados de forma heterogénea en la superficie de los nanotubos al aplicar el tratamiento oxidativo con ácidos y, por otro, al daño estructural producido sobre los nanotubos de carbono durante dicho tratamiento. Por el contrario, la funcionalización con PDDA origina sitios cargados localizados de forma uniforme sobre la superficie de los nanotubos, preservando sus propiedades estructurales, los cuales constituyen sitios de unión para la inmovilización electrostática de las nanopartículas o de sus precursores. La síntesis de PtNPs tiene lugar, en la mayoría de los casos, a través de la reducción *in situ* del anión de la sal precursora K_2PtCl_6 , previamente inmovilizado sobre los PDDA/CNTs con carga positiva, obteniéndose una carga máxima de PtNPs de aproximadamente un 50 % sobre los nanotubos [Wang, 2008]_b. Con el fin de obtener un mayor control sobre la forma y tamaño de las nanopartículas, se ha empleado también un método denominado “seed-mediated growth” (crecimiento mediante semillas) [Wang, 2009]_a, que consiste en la reducción de la correspondiente sal metálica con ácido ascórbico, en presencia de PtNPs previamente sintetizadas sobre la superficie de los CNTs. De este

modo se han obtenido híbridos de PDDA/CNTs con cargas de PtNPs de hasta un 93%, lo cual mejora las prestaciones electrocatalíticas del material híbrido hacia la oxidación de metanol. Igualmente, un material híbrido de PDDA/CNTs y nanopartículas de paladio (PdNPs), obtenido empleando el mismo método, ha demostrado un efecto electrocatalítico intenso hacia la oxidación de ácido fórmico [Wang, 2010]_d. Destaca por su originalidad la preparación de un híbrido de nanotubos de carbono, modificados con PDDA, y de nanoesferas huecas de Pd [Liu, 2010]. Este material muestra un fuerte efecto electrocatalítico hacia la oxidación de metanol, etanol y ácido fórmico, mejorado respecto del empleo de PdNPs y CNTs de forma aislada. Asimismo, se han preparado nanopartículas de Pt modificadas con Azul de Prusia para su posterior inmovilización electrostática sobre los PDDA/CNTs [Zhang, 2009]. Este material híbrido se ha empleado para la preparación de un sensor electroquímico mostrando una excelente actividad electrocatalítica y estabilidad operacional hacia el peróxido de hidrógeno. Los materiales híbridos basados en nanopartículas de platino también se han aplicado a la construcción de biosensores. Por ejemplo, se ha descrito un biosensor altamente selectivo para la determinación de glucosa a bajos valores de potencial, basado en el empleo de nanotubos de carbono modificados primero con PDDA y después con PSS, para la posterior deposición de capas alternas de dendrímeros de nanopartículas de Pt (PtDENS), con carga positiva, y de la enzima GOx [Xu, 2007].

En cuanto a los materiales híbridos PDDA/CNTs con nanopartículas de oro, éstos se han aplicado preferentemente a la preparación de biosensores. Por ejemplo, Yao y col. describieron un biosensor de glucosa en el que se demostró que el recubrimiento de glucosa oxidasa era un orden de magnitud mayor que el obtenido cuando se empleaban nanopartículas de oro o nanotubos de carbono por separado, obteniéndose además un valor más alto de la constante de transferencia electrónica. Este hecho se atribuye al aumento del área superficial activa en presencia de ambos componentes [Yao, 2008]. Se ha descrito también la preparación de un inmunosensor tipo sandwich para la determinación de IgG en suero basado en el empleo de un electrodo de carbono vitrificado modificado con un material híbrido de nanoesferas de carbono recubiertas con PDDA y AuNPs, empleando un anticuerpo secundario

marcado con HRP [Cui, 2010]. El mismo grupo de investigación ha preparado un inmunosensor tipo sándwich para la determinación del mismo antígeno empleando un material híbrido de PDDA/CNTs-AuNPs, empleando en este caso un bioconjugado del anticuerpo secundario con AuNPs y HRP para la detección amplificada del antígeno [Cui, 2008]. En esta última configuración se obtuvo un límite de detección de 40 pg ml^{-1} , el cual es aproximadamente 50 veces menor que el obtenido en el formato anterior sin amplificación.

Por otro lado, la naturaleza catiónica del PDDA permite la inmovilización estable de enzimas que se encuentran cargadas negativamente por encima de su punto isoeléctrico. Por ejemplo, se ha descrito la preparación de un biosensor de glucosa por modificación de un sustrato de oro sucesivamente con cisteamina, AuNPs, PDDA y MWCNTs para la posterior inmovilización de glucosa oxidasa previa deposición de una nueva capa de PDDA [Liu, 2007]_a. Asimismo, se ha descrito otro biosensor de glucosa basado en un electrodo de grafito pirolítico modificado con nanotubos de carbono y nanopartículas de ZnO recubierto con una película de PDDA con el fin de evitar la pérdida de enzima y el ensuciamiento superficial [Wang, 2009]_b. Además, el PDDA también ha demostrado ser adecuado para la adsorción electrostática de films de ADN, cargados negativamente debido a los grupos fosfato que poseen en su estructura. En este sentido se ha descrito un inmunosensor para la determinación de α -fetoproteína basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con PDDA/CNTs sobre el cual se ha inmovilizado una película de ADN. En este diseño, el ADN con carga negativa sirve de soporte para la posterior inmovilización de tionina como mediador, con carga positiva, y de AuNPs, cargadas negativamente, para la inmovilización final del anticuerpo [Ran, 2010].

Igualmente se ha descrito la preparación de un biosensor de tirosinasa basado en nanopartículas de magnetita aminofuncionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$), que suspendidas en medio básico están cargadas negativamente para su inmovilización sobre nanotubos de carbono modificados con PDDA [Cheng, 2009]. Recientemente se ha descrito la preparación de un inmunosensor para la determinación de HIgG basado en el empleo de un material híbrido de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y quantum dots [Jie, 2009]. En esta configuración los nanotubos de carbono recubiertos con poli-

(hidrocloruro de alilamina) (PAH) sirven de soporte para la inmovilización de los CdSeQD, cargados negativamente. Posteriormente, tras la deposición de una película intermedia de PDDA, se inmovilizan las AuNPs, las cuales sirven de soporte para inmovilización del anticuerpo.

- **[Abad, 2002]:** Abad, J.; Velez, M.; Santamaría, C.; Guisan, J.; Matheus, P.; Vázquez, L.; Gazaryan, I.; Gorton, L.; Gibson, T.; Fernández, V. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 12845-12853.
- **[Agüí, 2007]:** Agüí, L.; Peña-Farfal, C.; Yanez-Sedeño, P.; Pingarron, J. M. *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7946-7952.
- **[Agüí, 2008]:** Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 11-47.
- **[Ahuja, 2007]:** Ahuja, T.; Mir, I. A.; Kumar, D. *Biomaterials* 28 (2007) 791-805.
- **[Alexeyeva, 2008]:** Alexeyeva, N.; Tammeveski, K. *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 140-146.
- **[Aqel, en prensa]:** doi:10.1016/j.arabjc.2010.08.022.
- **[Balasubramanian, 2006]:** Balasubramanian, K.; Burghard, M. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 452-468.
- **[Bavastrello, 2004]:** Bavastrello, V.; Stura, E.; Carrara, S.; Erokhin, V.; Nicolini, C. *Sens. Actuators B: Chem.* 98 (2004) 247-253.
- **[Ben-Valid, 2010]:** Ben-Valid, S.; Botka, B.; Kamarás, K.; Zeng, A.; Yitzchaik, S. *Carbon* 48 (2010) 2773-2781.
- **[Bethune, 1993]:** Bethune, S.; Klang, C. H.; de Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vasquez, J.; Beyers, R. *Nature* 363 (1993) 605-607.

- **[Britto, 1996]:** Britto, P.J.; Santhanam, K.S.V.; Ajayan, P.M. *Biosens. Bioelectron.* 41 (1996) 121-125.
- **[Callegari, 2004]:** Callegari, A.; Cosnier, S.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Georgakilas, V.; Tagmatarchis, N.; Vázquez, E.; Prato, M. *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 807-810.
- **[Campuzano, 2010]:** Susana Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; José Yuste, J.; Pedrero, M. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1225-1230.
- **[Centi, 2007]:** Centi, S.; Laschi, S.; Mascini, M. *Talanta* 73 (2007) 394-399.
- **[Chakraborty, 2010]_a:** Chakraborty, S.; Raj, C. R. *Sens. Actuators B: Chem.* 147 (2009) 222-227.
- **[Chakraborty, 2010]_b:** Chakraborty, S.; Raj, C. R. *Carbon* 48 (2010) 3242-3249.
- **[Chen, 2007]:** Chen, Y.; Li, Y.; Wang, H.; Yang, M. *Carbon* 45 (2007) 357-363.
- **[Cheng, 2005]:** Cheng, G.; Zhao, J.; Tu, Y.; He, P.; Fang, Y. *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 11-16.
- **[Cheng, 2009]:** Cheng, Y.; Liu, Y.; Huang, J.; Li, K.; Xian, Y.; Zhang, W.; Jin, L. *Electrochim. Acta* 54 (2009) 2588-2594.
- **[Correa-Duarte, 2004]:** Correa-Duarte, M. A.; Sobal, N.; Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M. *Adv. Mater.* 16 (2004) 2179-2184.
- **[Correa-Duarte, 2006]:** Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M. *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 22-25.
- **[Cui, 2007]:** Cui, X.; Li, C. M.; Zang, J.; Zhou, Q.; Gan, Y.; Bao, H.; Guo, J.; Lee, V. S.; Moochhala, S. M. *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 2025-2031.
- **[Cui, 2008]:** Cui, R.; Huang, H.; Yin, Z.; Gao, D.; Zhu, J. J. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1666-1673.
- **[Cui, 2010]:** Cui, R.; Zhu, J. J. *Electrochim. Acta* 55 (2010) 7814-7817.
- **[Delgado, 2008]:** Delgado, J. L.; Herranz, M. A.; Martín, N. *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 1417-1426.
- **[Dhand, 2008]:** Dhand, C.; Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. *Anal. Biochem.* 383 (2008) 194-199.

- [Escosura-Muñiz, 2010]: Escosura-Muñiz, A.; Maltez-da Costa, M.; Sánchez-Espinell, C.; Díaz-Freitas, B.; Fernández-Suarez, J.; González-Fernández, A.; Merkoçi, A. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1710-1714.
- [Gajendran, 2007]: Gajendran, P.; Saraswathi, R. *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 11320-11328.
- [Gao, 2003]: Gao, M.; Dai, L.; Wallace, G. G. *Synth. Met.* 137 (2003) 1393-1394.
- [Guimard, 2007]: Guimard, N. K.; Gómez, N.; Schmidt, C. E. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 876-921.
- [Guo, 2005]: Guo, M.; Chen, J.; Li, J.; Tao, B.; Yao, S. *Anal. Chim. Acta.* 532 (2005) 71-77.
- [Hall, 2002]: Hall, R. H. *Microbes Infect.* 4 (2002) 425-432.
- [Haussling, 1991]: Häussling, L.; Michel, B.; Ringsdorf, H.; Rohrer, H. *Angew. Chem.* 30 (1991) 569-572.
- [Hayat, 2011]: Hayat, A.; Barthelmebs, L.; Marty, J. L. *Anal. Chim. Acta* 690 (2011) 248-252.
- [He, 2006]: He, P.; Xu, Y.; Fang, Y. *Microchim. Acta* 152 (2006) 175-186
- [He, 2009]: He, L.; Jia, Y.; Meng, F.; Li, M.; Liu, J. *Mater. Sci. Eng. B* 163 (2009) 76-81.
- [Helali, 2006]: Helali, S.; Martelet, C.; Abdelghani, A.; Maaref, M. A.; Jaffrezic-Renault, N. *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5182-5186.
- [Hervas, 2010]: Mirian Hervás, M.; López, M. A.; Escarpa, A. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1755-1760.
- [Hu, 2011]: Hu, Y., Zhao, Z., Wan, Q. *Bioelectrochem.* 81 (2011) 59-64.
- [Iijima, 1991]: Iijima, S. *Nature* 354 (1991) 56-58.
- [Iijima, 1993]: Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* 363 (1993) 603-605.
- [Iler, 1966]: Iler, R. K. *J. Colloid Interface Sci.* 21 (1966) 569-573.
- [Jiang, 2006]: Jiang, X.; Zhang, L.; Dong, S. *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1137-1141.
- [Jie, 2009]: Jie, G. ; Li, L. ; Chen, C. ; Xuan, J. ; Zhu, J. J. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3352-3358.

- **[Jung, 2007]:** Jung, Y.; Lee, J.; Jung H.; Chung, B. *Anal. Chem.* 79 (2007) 6534-6541.
- **[Koizhaiganova, 2009]:** Koizhaiganova, R. B.; Kim, H. J.; Vasudevan, T.; Lee, M. S. *Synth. Met.* 159 (2009) 2437-2442.
- **[Kroto, 1985]:** Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* 318 (1985) 162-163.
- **[Kum, 2007]:** Kum, M. C.; Joshi, K. A.; Chen, W.; Myung, N. V.; Mulchandani, A. *Talanta* 74 (2007) 370-375.
- **[Lawrence, 2005]:** Lawrence, N. S.; Deo, R. P.; Wang, J. *Electroanalysis* 17 (2005) 65-72.
- **[Lermo, 2009]:** Lermo, A.; Fabiano, S.; Hernández, S.; Galve, R.; Marco, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2057-2063.
- **[Li, 2007]:** Li, Y. X.; Wang, P.; Wang, L.; Lin, X. Q. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 3120-3125.
- **[Li, 2009]:** Li, Y.; Ulmasankar, Y.; Chen, S. M. *Talanta* 79 (2009) 486-492.
- **[Liébana, 2009]:** Liébana, S.; Lermo, A.; Campoy, S.; Cortés, M. P. Alegret, S.; Pividori, M. A. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 510-513.
- **[Lin, 2006]:** Lin, Y.; Cui, X. *J. Mater.Chem.* 16 (2006) 585-92.
- **[Liu, 2007]_a:** Liu, Y.; Wu, S.; Ju, H. X.; Xu, L. *Electroanalysis* 19 (2007) 986-992.
- **[Liu, 2010]:** Liu, Z.; Zhao, B.; Guo, C.; Sun, Y.; Shi, Y.; Yang, H.; Li, Z. *J. Colloid Interface Sci.* 351 (2010) 233-238.
- **[Lu, 1996]:** Lu, B.; Smith, M. R.; O'Kennedy, R. *Analyst* 121 (1996) 29-32.
- **[Luo, 2004]:** Luo, X. L.; Xu, J. J.; Du, Y.; Chen, H. Y. *Anal. Biochem.* 334 (2004) 284-289.
- **[Luo, 2006]:** Luo, X.; Killard, A. J.; Morrin, A.; Smyth, M. R. *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 39-44.
- **[Luque, 2006]:** Luque, G.; Ferreyra, N.; Rivas, G. *Microchim. Acta.* 152 (2006) 277-283.
- **[Malhotra, 2006]:** Malhotra, B. D. ; Chaubey, A.; Singh, S. P. *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 59-74.

- **[Mani, 2009]:** Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F. *ACS Nano* 3 (2009) 585-594.
- **[Manisankar, 2008]:** Manisankar, P.; Abirama-Sundari, P. L.; Sasikumar, R.; Palaniappan, S. P. *Talanta* 76 (2008) 1022-1028.
- **[Manso, 2008]:** Manso, J.; Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4007-4012.
- **[Merkoçi, 2005]:** Merkoci, A.; Pumera, M.; Lopis, X.; Pérez, B.; Del Valle, M.; Alegret, S. *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 826-838.
- **[Min, 2009]:** Min, K.; Yoo, Y. J. *Talanta* 80 (2009) 1007-1011.
- **[Moreno-Guzmán, 2010]:** Moreno-Guzmán, M.; Eguílaz, M.; Campuzano, S.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Analyst* 135 (2010) 1926-1933.
- **[Moreno-Guzmán, 2011]:** Moreno-Guzmán, M.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 125-130.
- **[Mousavi, 2009]:** Mousavi, Z.; Bobacka, J.; Lewenstam, A.; Ivaska, A. *J. Electroanal. Chem.* 633 (2009) 246-252.
- **[Peng, 2007]:** Peng, C.; Jin, J.; Chen, G. Z. *Electrochim. Acta* 53 (2007) 525-537.
- **[Pingarrón, 1999]:** Pingarrón, J.M.; Sánchez-Batanero, P. (1999) "Química electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones". Ed. Síntesis.
- **[Pingarrón, 2008]:** Pingarrón, J.M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. *Electrochim. Acta* 53 (2008) 5848-5866.
- **[Pumera, 2006]:** Pumera, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Sens. Actuators B: Chem.* 113 (2006) 617-622.
- **[Qin, 2010]:** Qin, X.; Wang, H.; Wang, X.; Miao, Z.; Chen, L.; Zhao, W.; Shan, M.; Chen, Q. *Sens. Actuators B: Chem.* 147 (2010) 593-598.
- **[Qu, 2005]:** Qu, F.; Yang, M.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R. *Anal. Biochem.* 344 (2005) 108-114.
- **[Rahman, 2009]:** Rahman, M. M.; Shiddiky, M. J. A.; Rahman, A.; Shim, J. B. *Anal. Biochem.* 384 (2009) 159-165.
- **[Ran, 2010]:** Ran, X. Q.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Hong, C. L.; Qian, X. Q. *Colloid. Surface. B: Biointerfaces* 79 (2010) 421-426.

- **[Reddy, 2009]:** Reddy, K. R.; Sin, B. C.; Ryu, K. S.; Kim, J. C.; Chung, H.; Lee, Y. *Synth. Met.* 159 (2009) 595-603.
- **[Richardson, 2001]:** Richardson, J.; Hawkins, P.; Luxton, R. *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 989-993.
- **[Rivas, 2007]:** Rivas, G. A.; Rubianes, M. D.; Rodríguez, M. C.; Ferreyra, N. F.; Luque, G. L.; Pedano, M. L.; Miscoria, S. A.; Parrado C. *Talanta* 74 (2007) 291-307.
- **[Romanazzo, 2010]:** Romanazzo, D.; Ricci, F.; Volpe, G.; Elliott, C. T.; Vesco, S.; Kroeger, K.; Moscone, D.; Stroka, J.; Egmond, H. V.; Vehniainen, M.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2615-2621.
- **[Santhanam, 2005]:** Santhanam, K. S. V.; Sangoi, R.; Fuller, L. *Sens. Actuators B: Chem.* 106 (2005) 766-771.
- **[Selvaraj, 2007]:** Selvaraj, V.; Alagar, M. *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 1145-1153.
- **[Selvaraju, 2008]:** Selvaraju, T.; Das, J.; Han, S. W.; Yang, H. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 932-938.
- **[Serra, 2002]:** Serra, B.; Jiménez, S.; Mena, M. L.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 217-226.
- **[Shahrokhian, 2009]:** Shahrokhian, S.; Asadian, E. *J. Electroanal. Chem.* 636 (2009) 40-46.
- **[Shi, 2011]:** Shi, Y.; Liu, Z.; Zhao, B.; Sun, Y.; Xu, F.; Zhang, Y.; Wen, Z.; Yang, H.; Li, Z. *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 29-33.
- **[Shirsat, 2008]:** Shirsat, M. D.; Too, C. O.; Wallace, G. G. *Electroanalysis* 20 (2008) 150-156.
- **[Tang, 2008]:** Tang, L.; Zhu, Y.; Yang, X.; Sun, J.; Li, C. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 319-323.
- **[Tasis, 2006]:** Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* 106 (2006) 1105-1136.
- **[Trojanowicz, 2006]:** Trojanowicz, M. *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480-489.
- **[Tsai, 2006]:** Tsai, Y. C.; Li, S. C.; Liao, S. W. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 495-500.

- [Tu, 2007]: Tu, X. ; Xie, Q. ; Jiang, S. ; Yao, S. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2819-2826.
- [Tuncagil, 2011]: Tuncagil, S.; Ozdemir, C.; Demirkol, D. O.; Timur, S.; Toppare, S. *Food Chemistry* 127 (2011) 1317-1322.
- [Umasankar, 2011]: Umasankar, Y.; Periasamy, A. P.; Chen, S. M. *Anal. Biochem.* 411 (2011) 71-79.
- [Vairavapandian, 2008]: Vairavapandian, D.; Vichchulada, P.; Lay, M. D. *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 119-129.
- [Van Hieu, 2009]: Van Hieu, N.; Dung, N. Q.; Tam, P. D.; Trung, T.; Chien, N. D. *Sens. Actuators B: Chem.* 140 (2009) 500-507.
- [Vaseashta, 2005]: Vaseashta, A.; Dimova-Malinovska, D. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 6 (2005) 312-318.
- [Veetil, 2007]: Veetil, J. V.; Ye, K. *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 517-531.
- [Wang, 2005]: Wang, J.; Musameh, M. *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 209-213.
- [Wang, 2006]_a: Wang, H. S.; Li, T. H.; Jia, W. L.; Xu, H. Y. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 664-669.
- [Wang, 2007]_a: Wang, L.; Guo, S.; Huang, L.; Dong, S. *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 827-832.
- [Wang, 2007]_b: Wang, J.; Xi, J.; Bai, Y.; Shen, Y.; Sun, J.; Chen, L.; Zhu, W.; Qiu, X. *J. Power Sources* 164 (2007) 555-560.
- [Wang, 2008]_a: Wang, L.; Guo, S.; Hu, X.; Dong, S. *Colloid. Surface. A: Physicochem. Eng. Aspects* 317 (2008) 394-399.
- [Wang, 2008]_b: Wang, S.; Jiang, S. P.; Wang, X. *Nanotechnol.* 19 (2008) 265601-265607.
- [Wang, 2009]_a: Wang, S.; Jiang, S. P.; White, T. J.; Guo, J.; Wang, X. *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 18935-18945.
- [Wang, 2009]_b: Wang, Y. T.; Yu, L.; Zhu, Z. Q.; Zhang, J.; Zhu, J. Z.; Fan, C. H. *Sens. Actuators B: Chem.* 136 (2009) 332-337.
- [Wang, 2010]_a: Wang, J.; Yuan, R.; Chai, Y.; Cao, S.; Guan, S.; Fu, P.; Min, L. *Biochem. Eng. J.* 51 (2010) 95-101.
- [Wang, 2010]_b: Wang, X.; Jiao, K. *Anal. Chim. Acta* 664 (2010) 34-39.

- **[Wang, 2010]_c**: Wang, D.; Lu, S.; Jiang, S. P. *Chem. Commun.* 46 (2010) 2058-2060.
- **[Wang, 2010]_d**: Wang, S.; Jiang, S. P.; White, T. J.; Wang, X. *Electrochim. Acta* 55 (2010) 7652-7658.
- **[Warsinke, 2000]**: Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W. *Fresen. J. Anal. Chem.* 366 (2000) 622-634.
- **[Wu, 2007]**: Wu, M. Q.; Zhang L. P.; Wang, D. M.; Gao, J. H. *Nanotechnol.* 18 (2007) 385603-385609.
- **[Xu, 2007]_a**: Xu, L.; Zhu, L.; Tang, L.; Yang, X.; Li, C. *Electroanalysis* 19 (2007) 717-722.
- **[Yang, 2005]_a**: Yang, D. Q.; Rochette, J. F.; Sacher, E. *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 4481-4484.
- **[Yang, 2009]_a**: Yang, T.; Zhou, N.; Zhang, Y.; Zhang, W.; Jiao, K.; Li, G. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2165-2170.
- **[Yao, 2008]**: Yao, Y. L.; Shiu, K. K. *Electroanalysis* 20 (2008) 1542-1548.
- **[Yoo, 2002]**: Yoo, E. M.; Chintalacharuvu, K. R.; Penichet, M. L.; Morrison, S. L. *J. Immunol. Methods* 261 (2002) 1-20.
- **[Yu, 2011]**: Yu, A.; Zhang, X.; Zhang, H.; Han, D.; Knight, A. R. *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9015-9019.
- **[Yuan, 2008]**: Yuan, J.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Shen, Y. F.; Han, D.; Zhang, Q.; Xu, X.; Niu, L. *Thin Solid Films* 516 (2008) 6531-6535.
- **[Yuanyuan, 2006]**: Yuanyuan, X.; Shanhong, X.; Chao, B.; Shaofeng, C. *Science in China: Series F Information Sciences* 49 (2006) 397-408.
- **[Zhang, 2007]_a**: Zhang, X.; Wang, J.; Wu, W.; Qian, S.; Man, Y. *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2098-2104.
- **[Zhang, 2008]**: Zhang, X. H.; Wang, S. M.; Jia, L.; Xu, Z. X.; Zeng, Y. *Sens. Actuators B: Chem.* 134 (2008) 477-482.
- **[Zhang, 2009]**: Zhang, J.; Li, J.; Yang, F.; Zhang, B.; Yang, X. *Sens. Actuators B: Chem.* 143 (2009) 373-380.
- **[Zhang, 2011]**: Zhang, S.; Shao, Y.; Yin, G.; Lin, Y. *Applied Catalysis B: Environmental* 102 (2011) 372-377.

- **[Zhou, 2009]:** Zhou, H.; Lin, Y.; Yu, P.; Su, L.; Mao, L. *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 965-968.
- **[Zhu, 2008]:** Zhu, Z. Z.; Wang, Z.; Li, H. L. *Applied Surf. Sci.* 254 (2008) 2934-2940.
- **[Zou, 2007]_a:** Zou, Y.; Sun, L.; Xu, F. *Talanta* 72 (2007) 437-442.
- **[Zou, 2007]_b:** Zou, Y.; Sun, L.; Xu, F. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2669-2674.

**II. DESARROLLO DE BIOSENSORES
AMPEROMÉTRICOS BASADOS EN EL
EMPLEO DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE
NANOTUBOS DE CARBONO Y
POLI(3-METILTIOFENO)**

Como se ha señalado en la Introducción, los materiales híbridos de nanotubos de carbono y un polímero conductor electrónico poseen propiedades mejoradas respecto a las de ambos componentes por separado. En el caso de emplear estos materiales para la construcción de sensores electroquímicos, se pone de manifiesto un efecto sinérgico intenso conducente a un incremento de la selectividad y/o la sensibilidad de la detección respecto a las observadas cuando se utiliza la superficie electródica modificada con un único material. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta el incremento de la superficie activa del electrodo que proporciona la conjunción de ambos materiales, así como la formación de agregados polímero-nanotubos que pueden reducir la distancia de intercalación de los iones facilitando la transferencia de carga e incrementando la conductividad del recubrimiento polimérico [Luo, 2006].

En nuestro grupo de investigación se tiene experiencia en la preparación de microelectrodos de fibra de carbono modificados con poli(3-metiltiofeno) (P3MT) [Agüí, 1999]. Este polímero se caracteriza por su elevada conductividad y la excelente estabilidad en su estado oxidado. Su presencia origina una mejora de la cinética electródica para la oxidación de diversos compuestos [Jaraba, 1998], así como una disminución notable del ensuciamiento superficial. Más recientemente, el material híbrido de nanotubos de carbono y P3MT [Agüí, 2007], demostró propiedades electrocatalíticas aún mejores, algunas de las cuales se investigan en este trabajo.

En la imagen (*Figura 16*) se muestra una micrografía electrónica de barrido de un electrodo de carbono vitrificado modificado con estos materiales. Pueden apreciarse los gránulos del polímero y los largos cilindros de nanotubos de carbono formando una malla sobre ellos.

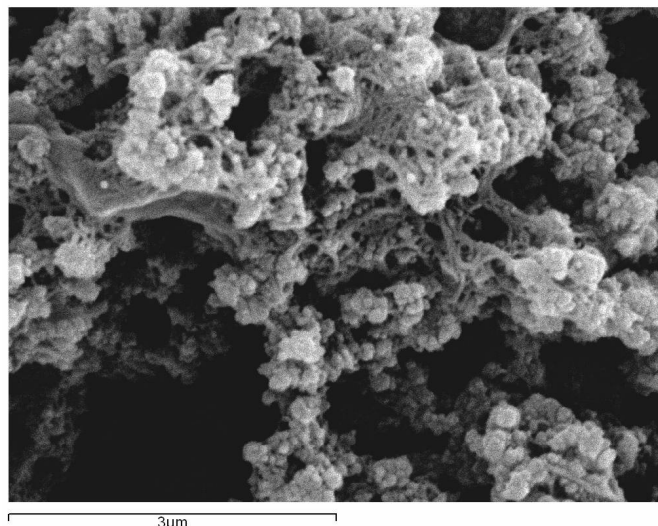


Figura 16. Micrografía electrónica de barrido de un electrodo P3MT/MWCNTs/GCE [Agüí, 2007].

En este Capítulo se describe la preparación y aplicaciones de dos biosensores basados en el empleo de electrodos de carbono vitrificado modificados con P3MT y nanotubos de carbono. En primer lugar se fabricó un biosensor de citocromo c por inmovilización de esta proteína con actividad pseudoperoxidasa, que exhibe transferencia electroquímica directa sobre el electrodo modificado. Posteriormente se preparó un biosensor enzimático de lactato deshidrogenasa, en el que se aprovecha la elevada sensibilidad alcanzada en la detección de NADH sobre el electrodo híbrido P3MT/MWCNTs/GCE. En ambos casos se optimizaron las variables experimentales que afectan a la modificación de la superficie electródica y a las respuestas amperométricas, evaluándose las características analíticas de los métodos desarrollados, su selectividad, y diferentes aspectos relacionados con la estabilidad de los biosensores. Finalmente la utilidad de éstos se demostró por aplicación a la determinación de nitrito, en el caso del biosensor de citocromo c, y de ácido láctico, en el caso del biosensor de lactato deshidrogenasa.

A continuación se describen los aspectos más relevantes de cada uno de estos diseños de biosensores basados en el material híbrido MWCNTs/P3MT.

BIOSENSOR DE CITOCROMO C BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(3-METILTIOFENO)

1

La determinación de peróxido de hidrógeno presenta un gran interés debido al importante papel que este compuesto juega en aplicaciones clínicas, industriales, alimentarias y medioambientales [Song, 2006]. Además, como subproducto de reacciones catalizadas por un gran número de enzimas, su determinación es la base de la fabricación de biosensores para la detección de especies como la glucosa, el ácido úrico o el colesterol [Yang, 2008]_o. La demanda de métodos cada vez más simples y baratos a la vez que específicos, sensibles y rápidos, así como el diseño de sistemas portátiles para llevar a cabo determinaciones de peróxido de hidrógeno "in situ", ha encontrado en el desarrollo de los biosensores electroquímicos un área de enorme actividad [Hsu, 2008]. Sin embargo, uno de los mayores problemas que conlleva esta determinación es el elevado sobrepotencial de oxidación que presenta el H₂O₂ cuando se utilizan superficies electródicas convencionales. Con el fin de disminuir este potencial y favorecer el proceso de transferencia electrónica, se han utilizado distintos mediadores redox, aunque su empleo, en algunos casos, puede originar problemas relacionados con la toxicidad del propio mediador, así como una baja sensibilidad y estabilidad del biosensor como consecuencia de los procesos de inmovilización utilizados [Salimi, 2007].

La enzima más empleada para la construcción de biosensores de H₂O₂ ha sido la peroxidasa de rábano (HRP), de fácil disponibilidad, elevada pureza y bajo coste [Song,

2006]. Esta enzima contiene un grupo prostético hemo, que es el encargado de catalizar la oxidación de gran variedad de sustratos aprovechando el poder oxidante del H_2O_2 [Wang, 2004]_b. Además de ésta, existen otras hemoproteínas con actividad de tipo peroxidasa, como son la hemoglobina [Lai, 2008], la mioglobina [Yang, 2006]_a y el citocromo c [Xiang, 2007]. En los últimos años se ha incrementado enormemente el número de publicaciones relacionadas con el empleo de estas metaloproteínas para la construcción de biosensores electroquímicos. Esto se debe fundamentalmente al interés por demostrar la capacidad de estas especies de exhibir transferencia electrónica directa sobre diferentes superficies electrónicas modificadas. Esta capacidad hace posible el desarrollo de biosensores de tercera generación, más simples, sin necesidad de usar mediadores [Yang, 2008]_a.

Las primeras investigaciones sobre la transferencia electrónica directa con metaloproteínas fueron publicadas en 1977 [Eddowes, 1977]. En ellas se observó que el citocromo c mostraba un comportamiento electroquímico reversible sobre un cristal conductor de óxido de indio dopado con óxido de estaño (ITO). Desde ese momento, esta especie, implicada en importantes funciones biológicas, se consideró una proteína modelo para el estudio de este tipo de reacciones de transferencia electrónica [Fedurco, 2000].

El citocromo c (Figura 17) es una metaloproteína de pequeño tamaño, soluble en agua, compuesta por una cadena polipeptídica sencilla de 104 aminoácidos unidos covalentemente a través de dos cisteínas a un grupo hemo C, que constituye el grupo prostético. El centro activo, $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, consiste en un anillo de porfirina donde los cuatro nitrógenos están coordinados a un átomo de hierro. Esta proteína se encuentra en el citosol, entre las membranas interna y externa de la mitocondria, donde se encarga de transferir electrones entre las enzimas citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa, ambas situadas en la membrana mitocondrial [Xu, 2007]_b.

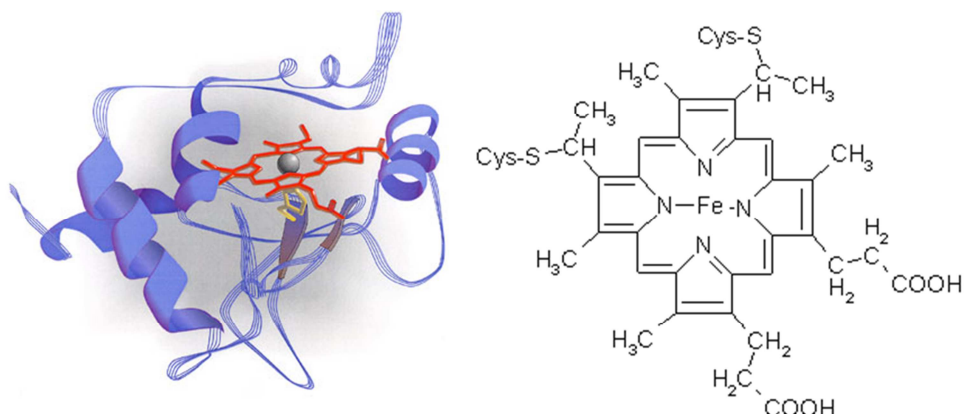


Figura 17. Estructura tridimensional del citocromo c y su grupo prostético.

La transferencia directa de electrones entre el citocromo c y una superficie electródica convencional no modificada, metálica o de carbono, es normalmente lenta debido a la fácil desnaturalización irreversible de la proteína en un ambiente rígido, y a la dificultad del contacto entre el grupo prostético y el electrodo, lo cual conduce a constantes de transferencia electrónica extremadamente pequeñas [Xiang, 2007]. Sin embargo, se ha demostrado que una orientación adecuada de la molécula sobre la superficie del electrodo resulta de gran importancia para asegurar una transferencia electrónica directa eficiente [Chen, 2000]. En este sentido, desde hace algunos años, se viene desarrollando un interesante campo de investigación centrado en optimizar el proceso de transferencia electrónica directa entre el citocromo c y la superficie electródica, habiéndose utilizado distintas estrategias y materiales de inmovilización con el objetivo de proporcionar microambientes biológicamente favorables hacia esta proteína [Lai, 2008]. Los biosensores de tercera generación basados en el citocromo c se han aplicado a la determinación de diversas especies, aparte del peróxido de hidrógeno. Entre ellas, destacan el óxido nítrico (NO) [Liu, 2007]_b y el anión nitrito [Geng, 2008].

En este trabajo se describe la preparación de un biosensor de citocromo c basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con un material híbrido de nanotubos de carbono y poli-(3-metil tiofeno). El citocromo c se inmovilizó sobre la

superficie de un electrodo P3MT/MWCNTs/GCE modificado con una monocapa autoensamblada de L-cisteína. El biosensor resultante Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE exhibe una intensa actividad electrocatalítica hacia la reducción del peróxido de hidrógeno sin necesidad de emplear mediador redox, Además, se observó que el citocromo c inmovilizado también catalizaba la oxidación del anión NO_2^- a NO_3^- , por lo que el biosensor desarrollado se aplicó satisfactoriamente a la determinación de nitrito.

A continuación se muestra la publicación resultante de este trabajo para, posteriormente, comentar sus aspectos más relevantes, así como describir aquellos estudios que no se incluyeron en el artículo.

A biosensor based on cytochrome c immobilization on a poly-3-methylthiophene/multi-walled carbon nanotubes hybrid-modified electrode. Application to the electrochemical determination of nitrite

Marcos Eguílaz, Lourdes Agüí, Paloma Yáñez-Sedeño, José M. Pingarrón

*Journal of Electroanalytical
Chemistry*



Vol. 644, pp. 30-35, 2010



A biosensor based on cytochrome *c* immobilization on a poly-3-methylthiophene/multi-walled carbon nanotubes hybrid-modified electrode. Application to the electrochemical determination of nitrite

M. Eguílaz, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2010

Received in revised form 15 March 2010

Accepted 19 March 2010

Available online 24 March 2010

Keywords:

Cytochrome *c*

Hybrid conducting polymer/carbon nanotubes

Hydrogen peroxide determination

Nitrite determination

ABSTRACT

A cytochrome *c* (Cyt *c*) electrochemical biosensor constructed by immobilization of the biomolecule on a hybrid material consisting of the conducting polymer poly-(3-methylthiophene) (P3MT) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) is reported. Cyt *c* was immobilized onto L-cysteine (L-Cys) self-assembled monolayer-modified P3MT/MWCNT/GCE at neutral pH, where positively charged Cyt *c* strongly interacts with L-Cys negatively charged sites. The electron transfer rate constant, k_s , was $0.49 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, and the surface coverage of Cyt *c*, Γ , $(1.6 \pm 0.8) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. Under the optimized conditions, the mediatorless biosensor exhibits good electrocatalytic activity towards H_2O_2 reduction. The amperometric measurements of H_2O_2 at an applied potential of 0.0 V in 0.05 M Tris–HCl buffer of pH 8.0 exhibited good repeatability (RSD = 3.1%, $n = 10$) and an acceptable reproducibility for the biosensor preparation (RSD = 8.1%, $n = 5$). The lifetime of the biosensor was evaluated. A linear calibration graph for H_2O_2 ($r = 0.998$) was obtained between 0.7 and 400 μM , with a detection limit of 0.23 μM . The analytical characteristics for H_2O_2 determination were found to be better than those reported for other nanostructured cytochrome *c* biosensors. The apparent Michaelis–Menten constant for the reaction between Cyt *c* and H_2O_2 was 451 μM . The developed Cyt *c*/L-Cys/P3MT/MWCNT/GCE biosensor was applied for the biocatalytic determination of nitrite through the oxidation of NO_2^- to NO_3^- by electrogenerated $[\text{Fe}^{4+}\text{-Cyt } c]$ species. Amperometry in stirred PBS solutions at a potential of +0.9 V allowed nitrite to be determined in a linear range between 10 and 100 μM , with a detection limit of 0.5 μM .

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The preparation of electrochemical sensors and biosensors taking advantage of the unique physical and chemical properties of nanomaterials, including biocompatibility, has acquired an increasing interest in the last years [1]. In particular, carbon nanotubes (CNT) have demonstrated to play a relevant role in this area due to their high chemical stability and excellent electronic and mechanical properties, which is profited to construct modified electrodes with improved electroanalytical performance [2,3]. A recent strategy within this area is the preparation of hybrid materials consisting of CNT and other materials able to improve the ability for an efficient immobilization of biomolecules. In this context, hybrids formed with CNT and conducting polymers have exhibited a synergic effect leading to significant enhancements in the electronic and mechanical characteristics of each single component [4,5]. These improved characteristics were attributed to the high active surface area of both components and the formation

of polymer-nanotubes aggregates able to reduce the intercalation ion distance, thus facilitating charge transfer and increasing the conductivity of the polymer [6]. Various electrochemical biosensors prepared from such type of hybrid materials have been reported. Glucose oxidase (GOx) enzyme electrodes using a glassy carbon electrode (GCE) modified with CNT and polypyrrole [7] or polyaniline [8] have been constructed. A bienzyme biosensor prepared by co-immobilizing horseradish peroxidase (HRP) and GOx on a gold electrode modified with CNT and polypyrrole has been used for the determination of glucose in serum [9]. Biosensors using hybrids of CNT and polyaniline have been reported for the determination of H_2O_2 [6], and choline [10]. Furthermore, a biosensor for glutamate based on self-assembled CNT and dendrimer-encapsulated platinum nanobiocomposites-doped polypyrrole films on a GCE has been also reported [11]. DNA sensors based on CNT-paste electrodes modified with polypyrrole [12], GCE modified with electropolymerized polypyrrole and multi-walled CNT [13], and magnetite with a GCE modified with CNT in polypyrrole [14] have been also reported. Recently, our group described on a GCE modified with a MWCNT/poly(3-methylthiophene) (P3MT) hybrid composite which exhibited an intense electrocatalytic ef-

* Corresponding author. Tel.: +34 913944315.

E-mail address: pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

fect towards several biomolecules of biochemical and analytical significance [5].

On the other hand, the development of third generation biosensors based on direct electron transfer (DET) from redox proteins to the electrode surface, which avoids the use of redox mediators, is also of growing interest [15,16]. So, hemoproteins with peroxidase activity such as haemoglobin or cytochrome *c* have been employed to catalyze H_2O_2 reduction [17]. It is well known that DET between cytochrome *c* and conventional unmodified electrode materials is generally slow due to the irreversible denaturation of the protein in a rigid environment as well as to the difficult contact between the prosthetic group and the electrode [17]. Several modification strategies and immobilization methodologies have been employed with the aim of providing biologically favourable microenvironments for the protein. In this context, ITO electrodes modified with polyaniline derivatives [18], and platinum electrodes modified with fully sulfonated polyaniline nano-networks [19] have been applied to the direct electrochemistry of cytochrome *c*. Moreover, a GCE modified with gold nanoparticles-polypyrrole composites has been used as immobilization matrix for cytochrome *c* preserving its electrochemical performance [20].

In this work, a cytochrome *c* biosensor has been constructed by immobilization of the biomolecule on a hybrid P3MT/MWCNT material-modified GCE. The resulting mediatorless biosensor exhibits good electrocatalytic activity towards H_2O_2 reduction, and it has been applied to the determination of nitrite. A literature survey on oxidative nitrite biosensors based on cytochrome *c* shows that only two recent papers have addressed this subject. The first one consisted of a sandwich structured SiO_2 gel/cytochrome *c*/ SiO_2 gel design constructed on conductive boron-doped diamond film substrate [21]. A later approach implied the development of a nitrite biosensor prepared via immobilization of cytochrome *c* onto a multi-walled carbon nanotubes-poly(amidoamine)-chitosan nanocomposite modified glassy carbon electrode [22].

2. Experimental

2.1. Apparatus and electrodes

Electrochemical measurements were carried out with a BAS (West Lafayette, IN, USA) 100B potentiostat provided with a BAS C2 EF-1080 cell stand. A Metrohm 6.084.010 glassy carbon electrode (3 mm \varnothing) modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and P3MT was used as working electrode. The reference electrode was a BAS MF 2063 Ag/AgCl 3 M electrode and a BAS MW-1032 platinum wire was used as the auxiliary electrode. BAS VC-2 10 mL electrochemical cells were also used.

2.2. Reagents and solutions

Stock 5.0×10^{-3} M (0.06 g mL^{-1}) cytochrome *c* (from bovine heart, Sigma) solutions and 0.10 M hydrogen peroxide solutions (Scharlab, 35% in water) were prepared by dissolving the product in the adequate supporting electrolyte. Aqueous stock 0.1 M l-cysteine (Sigma, 98%) solutions were also used. 0.05 M 3-methylthiophene (Aldrich, 99%) solutions in pure acetonitrile (HPLC grade, Scharlab) containing 0.1 M sodium perchlorate (Sigma, 99%) were also employed. 0.001 M sodium nitrite (Sigma, 99.9%) solutions were prepared in de-ionized water. MWCNT, 30 ± 15 nm \varnothing , with 95% purity were supplied from NanoLab (Brighton, MA), and used as received without any further treatment. 0.05 M phosphate buffer solutions of pH 7.0 and 8.0, and 0.2 M Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Scharlab, 99%), of pH 8.0 were used as supporting electrolytes. Other solvents and chemicals

used were of analytical reagent grade and water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

2.3. Preparation of the modified electrodes

2.3.1. P3MT-MWCNT-GCE

Hybrid conducting polymer/MWCNT-modified GC electrodes were prepared as follows [5]: firstly, the GCE surface was polished with 0.3 μm alumina slurries, rinsed thoroughly with de-ionized water, sonicated for 30 s in water and 30 s in acetone, and dried in air. Two milligrams of MWCNT were dispersed in 5 mL of an aqueous 0.1% Nafion solution using ultrasonic stirring for 45 min. A 10- μL aliquot of this dispersion was dropped on the GCE surface and the solvent was evaporated under an infrared heat lamp. Next, the MWCNT-GCE was immersed into a 0.05 M 3-methylthiophene solution in acetonitrile containing 0.1 M sodium perchlorate. Then, P3MT was grown by electropolymerization under applying three successive cyclic voltammograms between 0.0 and +1.7 V vs. Ag/AgCl at 20 mV s^{-1} .

2.3.2. Preparation of the cytochrome *c* biosensor

The P3MT-MWCNT-GCE was immersed into a previously de-aerated 0.02 M l-cysteine quiescent aqueous solution for 30 min, in the dark at room temperature. Next, the electrode was rinsed twice with de-ionized water. Immobilization of cytochrome *c* was carried out by dropping a 10- μL aliquot of a 0.6 mg mL^{-1} cytochrome *c* solution prepared in 0.1 M PBS of pH 7.0 onto the modified electrode surface, and letting the solvent evaporate at room temperature.

2.3.3. Determination of nitrite

Amperometry in stirred solutions at a constant potential of +0.9 V vs. Ag/AgCl was employed for the quantification of nitrite. The Cyt *c*/l-Cys/P3MT/MWCNT/GCE was immersed into the working solution and, after applying the detection potential, the steady-state current was measured.

3. Results and discussion

The enhanced electrocatalytic effect exhibited by P3MT/MWCNT hybrid-modified electrodes towards several biomolecules, with respect to single MWCNT or conductive polymer modified electrodes, led us to construct a mediatorless biosensor by immobilization of cytochrome *c* (Cyt *c*) on the hybrid material-modified electrode. This biosensor was electrochemically characterized and checked for the electrocatalytic reduction of H_2O_2 , and subsequently applied to the biocatalytic determination of nitrite.

3.1. Cytochrome *c* immobilization and its direct electrochemistry on P3MT/MWCNT/GCE

Different methodologies for cytochrome *c* immobilization were tested: electrodeposition by immersion of the electrode in a deoxygenated 0.5 mM Cyt *c* solution in PBS of pH 7.0 and application of successive cyclic voltammetric scans [15], incubation by immersion of the electrode for 14 h in a 0.5 mM Cyt *c* solution in PBS of pH 7.0 in darkness [23], and immobilization onto l-cysteine self-assembled monolayers-modified electrodes [24]. This latter approach exhibited a higher response of the sensor upon addition of 1.5 mM H_2O_2 (data not shown), which was expected considering the intense electrocatalytic effect observed for NO due to the l-Cys/Cyt *c* conjugation, where l-Cys acts as a promoter of the electron transfer [25]. This conjugation is very stable, because, at neutral pH, Cyt *c* is charged (+8) and strongly interacts electrostatically with l-Cys negatively charged sites. Therefore, as described in Sec-

tion 2, 10 μL of a 0.5 mM Cyt *c* solution in PBS of pH 7.0 were deposited onto the l-Cys-modified hybrid electrode and allowed drying at room temperature. The stepwise formation of the biosensor is displayed in Scheme 1. Fig. 1 shows cyclic voltammograms recorded at an l-Cys-modified hybrid electrode without Cyt *c* and at a modified electrode on which Cyt *c* was immobilized. A pair of redox peaks was observed at an anodic peak potential (E_{pa}) = 0.094 V and cathodic peak potential (E_{pc}) = 0.037 V (vs. Ag/AgCl 3 M), with a peak-to-peak separation of 57 mV, corresponding to the Cyt *c* heme Fe(III)/Fe(II) redox couple. This pair was not observed at the modified hybrid electrode with no Cyt *c*, thus suggesting that the hybrid material successfully acted as an appropriate substrate for the immobilization of the protein on the electrode surface and allowed the direct electron exchange between Cyt *c* and the electrode. Both the cathodic and the anodic peak currents varied linearly with the potential scan rate in the 25–500 mV s^{-1} range, which indicated that the electron reaction corresponded to a surface-controlled quasi-reversible process. Meanwhile, the peak-to-peak separation increased with increasing the scan rate.

The electron transfer rate constant, k_s , was calculated according to Laviron's theory for a surface-controlled electrode process [26] by means of the following equation:

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT}$$

where the α value, 0.51, was calculated from the slope values of the linear portions of the cathodic peak potentials vs. the logarithm of scan rate plots. The obtained value, $0.49 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, is higher than that of Cyt *c* adsorbed on ordered mesoporous niobium oxide films (0.28 s^{-1}) [27], and similar to those calculated for a NaY zeolite/GCE [28] and for a Cyt *c*/DNA/MWCNT/GCE [29]. Moreover, the surface coverage (Γ) of Cyt *c* immobilized on the surface of the modified hybrid electrode was also calculated by applying equation [30].

$$i_p = n^2 F^2 v \Gamma A / 4RT$$

A value of $(1.6 \pm 0.8) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ was obtained, which is around 10 times larger than the theoretical monolayer coverage ($1.4 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$) [31], and agrees with other surface coverage values obtained for Cyt *c* at carbon nanotubes-modified electrodes

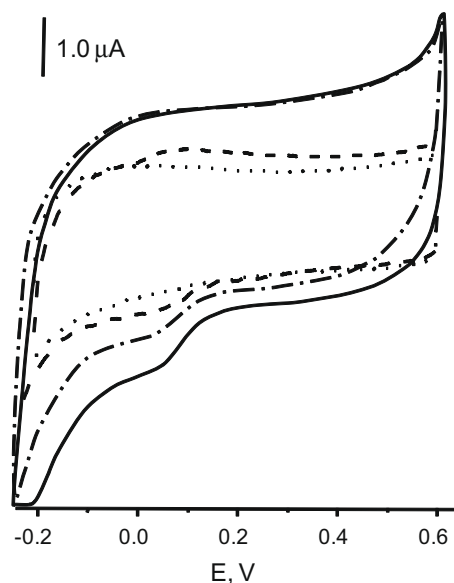
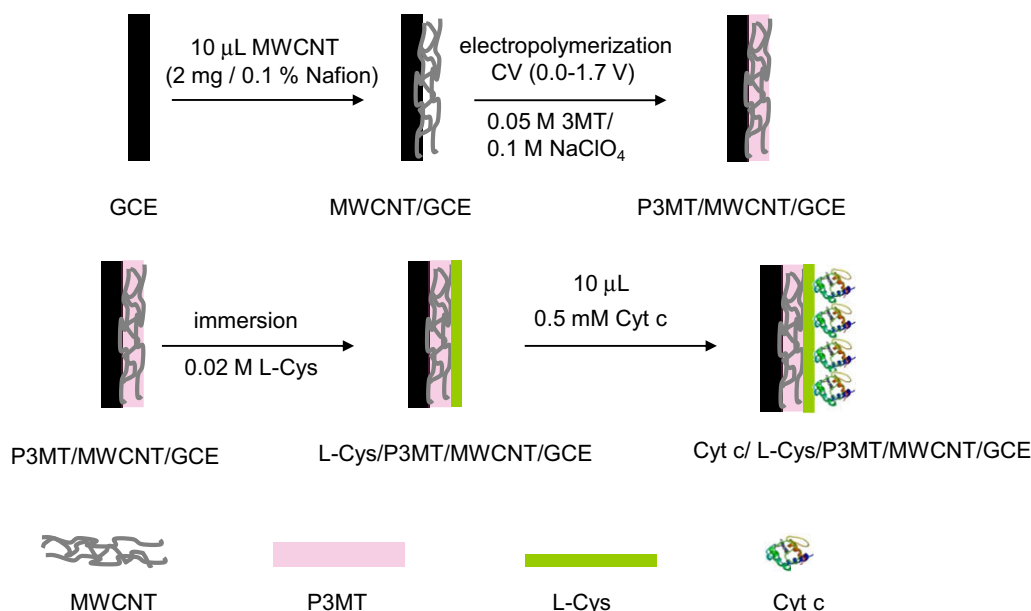


Fig. 1. Cyclic voltammograms recorded at a l-Cys/P3MT/GCE (...) and at a Cyt *c*/l-cys/P3MT/GCE for 0 mM H_2O_2 (- - -), 10 mM H_2O_2 (- - -), and 20 mM H_2O_2 (—); $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; 0.1 M PBS pH 7.0.

[32]. The calculated Γ value is the mean of six determinations between 50 and 500 mV s^{-1} , and the variation observed can be attributed to the lower Γ values obtained for the lower scan rates.

Fig. 1 displays also the voltammograms obtained after addition of H_2O_2 at two different concentration levels, showing as the reduction peak current increased with increasing the concentration of hydrogen peroxide.

The experimental conditions employed for the modification of P3MT/MWCNT/GCE with l-Cys SAMs were optimized. For these optimization studies, Cyt *c* biosensors were constructed by depositing on the modified electrode surface, 10 μL of a 0.5 mM Cyt *c* solution in 0.1 M PBS of pH 7.0. The electrochemical readouts were CVs recorded for 1.0 mM H_2O_2 at a scan rate of 50 mV s^{-1} . Parameters affecting the SAM formation such as temperature, time of immersion, stirring, pH of l-Cys solution and l-Cys concentration



Scheme 1. Scheme showing the stepwise preparation of Cyt *c*/l-Cys/P3MT/MWCNT/GCE biosensor.

were evaluated. The optimum selected conditions for I-Cys assembling are those described in Section 2.3.2.

The experimental conditions used in the Cyt *c* immobilization atop the I-Cys/P3MT/MWCNT/GCE were also optimized. Different 0.5 mM Cyt-*c* solutions prepared in phosphate buffer solutions of pH 2.0, 7.0 and 12.0 were checked. In all cases, 10 μ L of these solutions were deposited onto the I-Cys/P3MT/MWCNT/GCE. As expected, the highest voltammetric H₂O₂ reduction current was obtained at pH 7.0, where the Cyt *c* peroxidase activity is higher. Furthermore, this pH value is lower than the isoelectric point (10.05) and the protein is positively charged and retained in a stable way on the I-Cys monolayer. The Cyt *c* solution concentration was also evaluated in the 0.05–5.0 mM range. The recorded voltammograms exhibited a big increase in the capacitive current as the Cyt *c* concentration raised, with the H₂O₂ reduction peak practically disappearing at a protein concentration of 5.0 mM. As a compromise between a sufficient Cyt *c* loading and a well-defined voltammetric signal, a 0.5 mM Cyt *c* concentration in 0.1 M PBS of pH 7.0 was selected for further work.

3.2. Hydrogen peroxide amperometric determination at the Cyt *c*/I-Cys/P3MT/MWCNT/GCE

Considering the voltammograms displayed in Fig. 1, a detection potential of 0.0 V was selected to carry out the amperometric determination of the H₂O₂ reduction reaction. This detection potential allowed an improved selectivity for such determination.

A sharp increase of the current occurred when the solution pH raised from 5.0 to 9.0, while a slight decrease was observed at pH 9.0. Therefore, pH 8.0 was chosen for analytical purposes. Different buffers (0.1 M phosphate, Britton–Robinson, borate, MES and Tris–HCl) were tested as supporting background solutions. The best H₂O₂ signal-to-noise ratio was obtained in Tris–HCl buffer and, accordingly, this buffer solution was chosen as working medium. Concerning buffer concentration, no significant differences in the signal-to-noise ratio were found for buffer concentrations higher than 0.05 M, and, therefore, this value was selected for further work.

Under the optimized working conditions, a relative standard deviation (RSD) of 3.1% was obtained for 10 successive measurements of 0.01 mM H₂O₂, without any regeneration or treatment of the bioelectrode surface. Moreover, the responses obtained with five different Cyt *c* biosensors yielded a RSD value of 8.1%, thus showing an acceptable reproducibility for the biosensor preparation. The biosensor lifetime was evaluated by constructing a control chart displaying the mean values for 3 s_b/m successive measurements carried out on the same day. The upper and lower limits of control were set at $\pm 3 \times SD$ of the values obtained for the first day ($n=5$), and the biosensor was stored at 4 °C in 0.05 M PBS of pH 7.0 in between days. Fig. 2 shows that the mean current values remained inside the control limits for the first eight working days, with a slight decrease between days 8 and 12. This lifetime can be considered as acceptable when it is compared with that reported in the literature for other Cyt *c* biosensors configurations [15].

The constructed calibration graph for H₂O₂ exhibited a range of linearity ($r = 0.998$) between 0.7 and 400 μ M, with a slope value of 1.26 ± 0.02 nA/ μ M and an intercept of -4 ± 3 nA. A detection limit of 0.23 μ M was calculated according to the three s_b/m criterion, where m is the slope value of the linear calibration plot and s_b was estimated as the standard deviation calculated for 10 measurements of 0.7 μ M H₂O₂. Furthermore, a RSD value of 4.7% was obtained from 10 measurements for 20 μ M H₂O₂. These analytical characteristics for the amperometric determination of H₂O₂ improve those reported in the literature for other Cyt *c* biosensors. The achieved detection limit is remarkably lower than those ob-

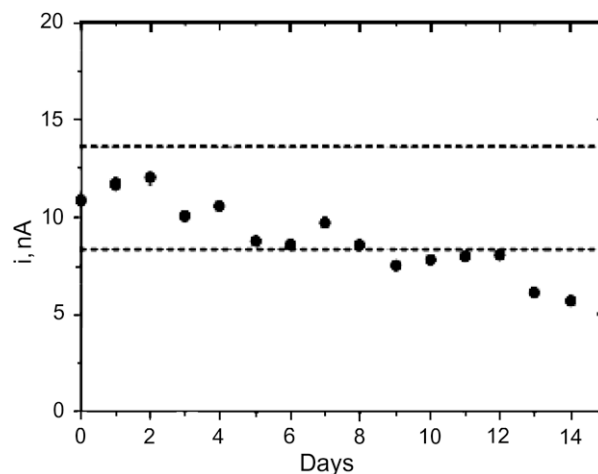


Fig. 2. Control chart constructed for a Cyt *c*/I-cys/P3MT/GCE biosensor. Points correspond to the mean values of three measurements for different 0.01 mM H₂O₂ solutions performed everyday.

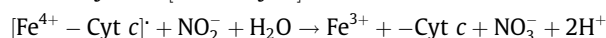
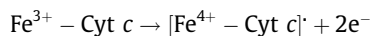
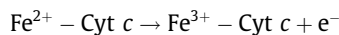
tained with other biosensors based on the use of carbon nanotubes [33,34], and gold nanoparticles [35,15]. In addition, the detection potential employed with the hybrid-modified electrode is 200–250 mV less negative. In particular, when the performance of the developed biosensor is compared with a Cyt *c*/MWCNT-modified GCE [33], an improvement in the detection limit of approximately one order of magnitude is achieved, which is in agreement with the expected synergic effect for the hybrid P3MT/MWCNT electronic transducer.

Moreover, the kinetic parameters for the reaction between Cyt *c* and H₂O₂ were calculated. Assuming a Michaelis–Menten type kinetics, the apparent Michaelis–Menten constant was calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plot. The K_M^{app} value was 451 μ M, which is remarkably lower than that calculated using other Cyt *c*-based sensors for H₂O₂ reported in the literature [15,24,33,35]. This indicates fairly well the high activity towards H₂O₂ of Cyt *c* immobilized onto the I-Cys/P3MT/MWCNT/GCE.

3.3. Biocatalytic determination of nitrite at the Cyt *c*/I-Cys/P3MT/MWCNT/GCE

Traditionally Cyt *c* based biosensors have been used for the determination of hydrogen peroxide and other analytes related to hydrogen peroxide quantification such as, for example, superoxide radicals [36–38]. However, recently other potential analytical applications of mediatorless Cyt *c* biosensors are being envisaged. Among them, the determination of nitrite is an interesting challenge which, as commented in Section 1, has received attention only very recently [21,22].

The mechanism involving the biocatalytic oxidation of nitrite is shown in the following reactions [21]:



Ferrous Cyt *c* is oxidized to ferric state at low potential. Then the ferric is oxidized to $[\text{Fe}^{4+} - \text{Cyt } c]$ at a higher potential. This latter species is highly reactive being able to oxidize NO₂⁻ to NO₃⁻ in solution.

We report here the biocatalytic oxidation of nitrite at the Cyt *c*-I-Cys-P3MT-MWCNT-GCE. Fig. 3 displays cyclic voltammograms recorded with background subtraction, obtained at the Cyt *c* biosensor in 0.1 M PBS solution of pH 7.0 containing two different

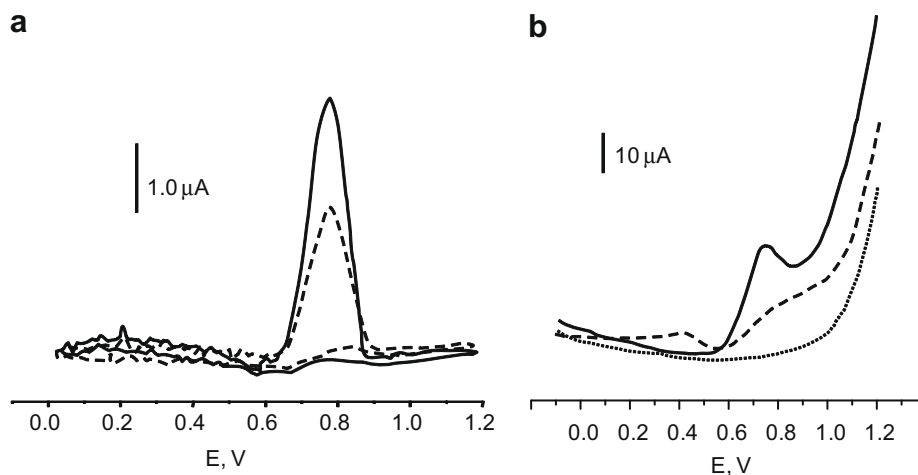


Fig. 3. (a) Cyclic voltammograms with background subtraction at Cyt *c*/l-cys/P3MT/GCE for: 0.1 mM NO_2^- (---) and 0.2 mM NO_2^- (—); $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$. (b) Differential pulse voltammograms at the Cyt *c*/l-Cys/P3MT/MWCNT/GCE for: 0 mM NO_2^- (.....), 0.5 mM NO_2^- (---) and 1.0 mM NO_2^- (—); $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$; 0.1 M PBS pH 7.0. $E = 50 \text{ mV}$.

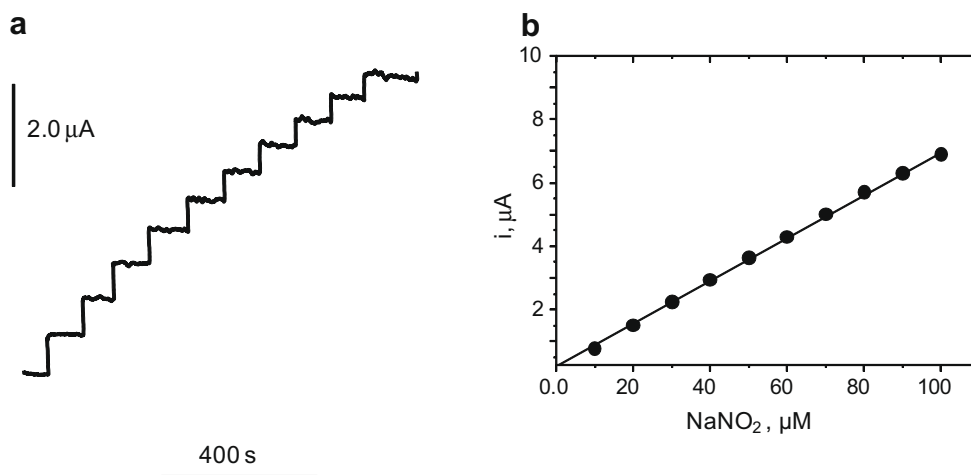


Fig. 4. (a) Amperometric responses for 10 μM NO_2^- additions, and (b) calibration plot for NO_2^- at the Cyt *c*/l-Cys/P3MT/MWCNT/GCE; $E_{\text{det}} = +0.9 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl; 0.1 M PBS pH 7.0.

nitrite concentrations. As it can be seen, an oxidation peak increasing with nitrite concentration appeared at +0.78 V, which should be attributed to the electrochemical formation of Cyt *c* π -cation because this is the species reacting with nitrite according to the reactions described above. Fig. 3b shows differential pulse voltammetric responses exhibiting well defined peaks whose height depended on the nitrite concentration.

Amperometry in stirred PBS solutions was applied to quantify nitrite. A detection potential of +0.9 V was selected from the cyclic voltammogram shown in Fig. 3. As it is deduced from Fig. 4, the Cyt *c*/l-Cys/P3MT/MWCNT/GCE exhibited a very rapid response to the changes in nitrite concentration, the steady-state current being reached in 6 s upon successive $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ nitrite additions. Under these conditions, a calibration graph was constructed for nitrite (Fig. 4b), with a linear range between 10 and 100 μM ($r = 0.9996$). The slope value of this calibration plot was $(7.04 \pm 0.07) \times 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$, and the intercept $0.16 \pm 0.04 \mu\text{A}$. The sensitivity achieved is slightly better (around three times higher) than that reported by Geng at a $\text{SiO}_2/\text{Cyt } c/\text{SiO}_2/\text{BDD}$ electrode considering the actual surface area [21]. The limit of detection, 0.5 μM , was calculated according to the criterion of a signal-to-noise ratio = 3. When comparing the analytical characteristics of this biosensor with

those reported for other biosensors for nitrite determination based on the oxidation responses, it can be stated that the operating potential is the same that those employed with the $\text{SiO}_2/\text{Cyt } c/\text{SiO}_2/\text{BDD}$ electrode [21], and slightly higher than that reported with a Cyt *c*/MWCNT/PAMAM/chitosan/GCE (0.7 V) [22]. Regarding the achieved detection limit, it is similar to that reported using the $\text{SiO}_2/\text{Cyt } c/\text{SiO}_2/\text{BDD}$ electrode [21], but it is remarkably better than those claimed for myoglobin/ZnO/graphite (4 μM) [39] and haemoglobin/colloidal gold/ TiO_2 sol-gel film/GCE (1.2 μM) [40] configurations.

4. Conclusions

The mediatorless cytochrome *c* biosensor, constructed using a GCE modified with the hybrid material P3MT/MWCNT on which an l-Cys monolayer was self-assembled, exhibits a good electrochemical performance concerning direct electron transfer, as well as improved electrocatalytic ability towards H_2O_2 reduction, as a consequence of the synergic effect achieved using the hybrid material as the transducer. This modification allows a detection potential for H_2O_2 to be used as low as 0.0 V without worsening of other

analytical characteristics. Both the achieved detection limit and the K_M^{app} value demonstrate enhanced analytical performance when compared with other Cyt *c*-based sensors for H₂O₂ reported in the literature. Furthermore, the Cyt *c*-I-Cys-P3MT-MWCNT-GCE has been successfully used for the biocatalytic determination of nitrite, with a better sensitivity than that obtained with the very few reported Cyt *c*-based approaches for this kind of analysis.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01, CTQ2009-12650 and CTQ2009-09351) is gratefully acknowledged.

References

- [1] A. Vaseashta, D. Dimova-Malinovska, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 6 (2005) 312.
- [2] M. Trojanowicz, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480.
- [3] L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 11.
- [4] J. Wang, M. Musameh, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 209.
- [5] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7946.
- [6] X. Luo, A.J. Killard, A. Morrin, M.R. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 39.
- [7] Y.-C. Tsai, S.-C. Li, S.-W. Liao, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 495.
- [8] Y. Zou, L. Sun, F. Xu, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2669.
- [9] L. Zhu, R. Yang, J. Zhai, C. Tian, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 528.
- [10] F. Qu, M. Yang, J. Jiang, G. Shen, R. Yu, *Anal. Biochem.* 344 (2005) 108.
- [11] L. Tang, Y. Zhu, X. Yang, C. Li, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 145.
- [12] H. Qi, X. Li, P. Chen, C. Zhang, *Talanta* 72 (2007) 1030.
- [13] Y. Xu, X. Ye, L. Yang, P. He, Y. Fang, *Electroanalysis* 18 (2006) 1471.
- [14] G. Cheng, J. Zhao, Y. Tu, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 11.
- [15] G. Yang, R. Yuan, Y.-Q. Chai, *Colloids Surf. B* 61 (2008) 93.
- [16] G.-S. Lai, H.-L. Zhang, D.-Y. Han, *Sens. Actuators B* 129 (2008) 497.
- [17] C. Xiang, Y. Zou, L.-X. Sun, F. Xu, *Talanta* 74 (2007) 206.
- [18] X. Jiang, L. Zhang, S. Dong, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1137.
- [19] L. Zhang, X. Jiang, L. Niu, S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1107.
- [20] J. Njagi, S. Andreescu, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 168.
- [21] R. Geng, G. Zhao, M. Liu, M. Li, *Biomaterials* 29 (2008) 2794.
- [22] Q. Chen, S. Ai, X. Zhu, H. Yin, Q. Ma, Y. Qiu, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2991.
- [23] X. Zhang, J. Wang, W. Wu, S. Qian, Y. Man, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2098.
- [24] J.-M. Xu, W. Li, Q.-F. Yin, Y.-L. Zhu, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 3601.
- [25] Y.-C. Liu, S.-Q. Cui, J. Zhao, Z.-S. Yang, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 416.
- [26] F. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979) 19.
- [27] F. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* 100 (1979) 262.
- [28] X. Xu, B. Tian, J. Kong, S. Zhang, B. Liu, D. Zhao, *Adv. Mater.* 15 (2003) 1932.
- [29] Z. Dai, S. Liu, H. Ju, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 2139.
- [30] J.W. Shie, U. Yogeswaran, S.M. Chen, *Talanta* 74 (2008) 1659.
- [31] R.E. Dickerson, T. Takano, D. Eisenberg, O.B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1511.
- [32] J.W. Shie, U. Yogeswaran, S.M. Chen, *Talanta* 74 (2008) 1659.
- [33] G.-G. Zhao, Z.-Z. Yin, L. Zhang, X.-W. Wei, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 256.
- [34] C. Xiang, Y. Zou, L.-X. Sun, F. Xu, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 38.
- [35] J.-J. Feng, G. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 280.
- [36] S. Shipovskov, E. Feranpontova, I. Garzayan, T. Ruzgas, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 277.
- [37] Y. Tian, L. Mao, T. Okajima, T. Ohsaka, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 557.
- [38] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, R. Rouillon, C. Calas-Blanchard, J.-L. Marty, *Bioelectrochemistry* 76 (2009) 76.
- [39] G. Zhao, J.J. Xu, H.Y. Chen, *Anal. Biochem.* 350 (2006) 145.
- [40] W. Yang, Y. Bai, Y. Li, C. Sun, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 44.

1.1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución de Nafion al 0.1 % (p/p): se prepara por dilución de 0.2 mL de Nafion 5% (p/p) (Aldrich) en 10 mL de agua desionizada.
- Dispersión de nanotubos de carbono 0.4 mg mL⁻¹: se prepara a partir de 2 mg de MWCNTs (Nanolab, de 30 ± 15 nm de diámetro) en 5 mL de Nafion al 0.1% por agitación mediante ultrasonidos durante 45 minutos.
- Disolución patrón de 3-metiltiofeno 0.1 M: se prepara por pesada directa de 0.4909 g de monómero 3-metiltiofeno (3MT) (Aldrich) y posterior dilución con acetonitrilo (CH₃CN) (Scharlau) hasta un volumen final de 50 mL.
- Disolución patrón de perclorato sódico 0.2 M: se disuelven 1.224 g de perclorato sódico (NaClO₄) (Sigma) en 50 mL de acetonitrilo (Scharlau).
- Disolución patrón de L-cisteína 0.1 M: se disuelven 0.1212 g de L-cisteína (L-Cys) (Sigma) en 10 mL de agua desionizada.
- Disolución patrón de citocromo c (Cit c) 5 mM: se disuelven 60 mg de citocromo c (from Bovine Heart, Sigma) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.1 M: se preparada por dilución de 9 µL de H₂O₂ 35% (Scharlau) en 1 mL de disolución reguladora adecuada. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de nitrito sódico 0.01 M: se disuelven 6.9 mg de NaNO₂ (Sigma) en 10 mL de agua desionizada.
- Disoluciones patrón de compuestos interferentes: se disuelve la cantidad adecuada de cada compuesto en 1 mL de disolución reguladora. Se han preparado disoluciones de ácido ascórbico (Fluka), catecol (Sigma), ácido

homovanílico (Sigma), dopamina (Sigma), acetaminofenona (Fluka), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (Sigma) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Aldrich), todas ellas en concentración 0.1 M, y ácido úrico (Sigma) en concentración 2 mM. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.

- Disoluciones reguladoras 0.1 M: se han preparado disoluciones reguladoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, Tris-HCl, Britton-Robinson, $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{BO}_2^-$ y ácido 4-morfolinoetanosulfónico, disolviendo la cantidad adecuada de los reactivos en agua desionizada. El pH se ajusta al valor adecuado con NaOH 2 M o HCl 4 M, según corresponda.
- Disolución de trabajo para la determinación de peróxido de hidrógeno: se ha empleado disolución reguladora Tris-HCl 0.05 M de pH 8.0.
- Disolución de trabajo para la determinación de Nitritos: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0.

1.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(3-METILTIOFENO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (P3MT/MWCNTs/GCE)

El procedimiento seguido para la preparación de este electrodo se basa en un método desarrollado anteriormente en nuestro grupo de investigación [Agüí, 2007] y puede describirse, brevemente, a través de las siguientes etapas:

Pretratamiento del electrodo:

Antes de modificar su superficie, se debe realizar el acondicionamiento del electrodo con el fin de asegurar la eliminación completa de posibles contaminantes y la obtención de una superficie perfectamente limpia y reproducible. El tratamiento seguido consiste, en primer lugar, en pulir, mediante agitación constante durante un minuto, la superficie de carbono vitrificado sobre una suspensión acuosa de alúmina

en polvo de 0.3 μm (Metrohm), enjuagando a continuación con agua desionizada. Posteriormente, se somete al electrodo a agitación en un baño de ultrasonidos (P-Selecta), primero durante 30 segundos en agua destilada, y seguidamente, otros 30 segundos en acetona (Scharlau), dejándolo secar finalmente a temperatura ambiente.

Recubrimiento con MWCNTs:

A continuación, una vez seca, la superficie del electrodo se modifica con una alícuota de 10 μL de una dispersión de nanotubos de carbono (0.4 mg mL^{-1}), y se deja evaporar el disolvente bajo una lámpara de radiación IR.

Electrodeposición del polímero conductor:

Tras dejar enfriar el electrodo a temperatura ambiente, se lleva a cabo la incorporación del polímero poli(3-metiltiofeno) por electrodeposición. Brevemente, se sumerge el electrodo MWCNTs/GCE en una disolución, previamente desoxigenada, que contiene el monómero 3-metiltiofeno (3MT) en concentración 0.05 M y perclorato sódico (NaClO_4) en concentración 0.1 M, ambos en acetonitrilo (CH_3CN). La electropolimerización se lleva a cabo en una célula electroquímica que contiene el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar de alambre de Pt, aplicando tres ciclos sucesivos mediante voltamperometría cíclica entre 0 y 1.7 V a 20 mV s^{-1} (Figura 18).

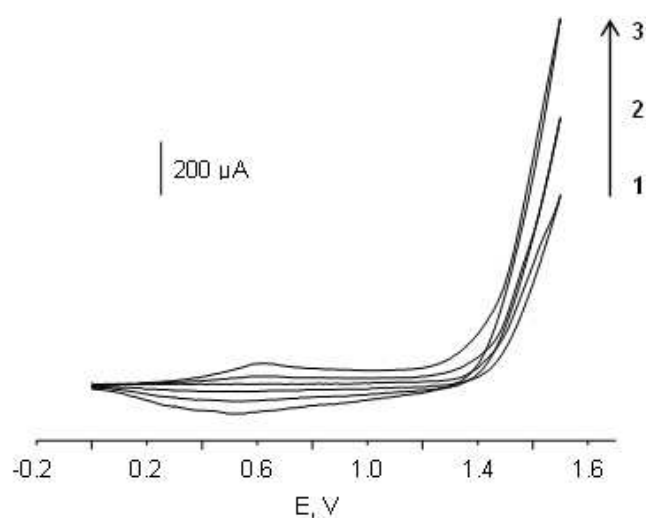


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos para la electropolimerización de P3MT sobre el electrodo MWCNTs/GCE.

Acondicionamiento del electrodo modificado:

Finalmente, una vez completados los ciclos, se aplica al electrodo sumergido en la misma disolución, un potencial constante de 0.7 V durante 600 segundos. A continuación, el electrodo se introduce en una disolución reguladora de fosfato 0.05 M de pH 7.0 donde se lleva a cabo la limpieza del recubrimiento polimérico por aplicación de barridos cíclicos de potencial entre 0.0 y 0.7 V hasta estabilización de la corriente de fondo (10 ciclos a 20 mV s^{-1}).

1.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE CITOCROMO C

A continuación, una vez preparado el electrodo, la inmovilización de la proteína Citocromo c sobre su superficie se lleva a cabo en dos etapas:

Formación de la monocapa autoensamblada:

Para la deposición de la monocapa autoensamblada, el electrodo preparado por el procedimiento anterior (P3MT/MWCNTs/GCE) se sumerge en una disolución acuosa y desoxigenada de L-cisteína (L-Cys) 0.02 M durante 30 minutos sin agitación, en un lugar oscuro y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lava dos veces con agua desionizada para eliminar posibles restos de cisteína no adsorbida en su superficie y se deja secar a temperatura ambiente.

Inmovilización de la proteína:

Una vez depositada la monocapa de L-Cys se procede a la inmovilización de citocromo c (Cit c). En este sentido, sobre la superficie del electrodo L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE se deposita una alícuota de 10 μL de una disolución conteniendo 0.5 mM de esta proteína, preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0, dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Finalmente, el biosensor se aclara con agua destilada y se almacena en disolución reguladora de fosfato a 4°C hasta su uso, dejando esperar un tiempo para que el biosensor alcance la temperatura ambiente antes de realizar las medidas electroquímicas.

En la *Figura 19* se muestra el esquema seguido para la preparación del biosensor de citocromo c, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato del citocromo c.

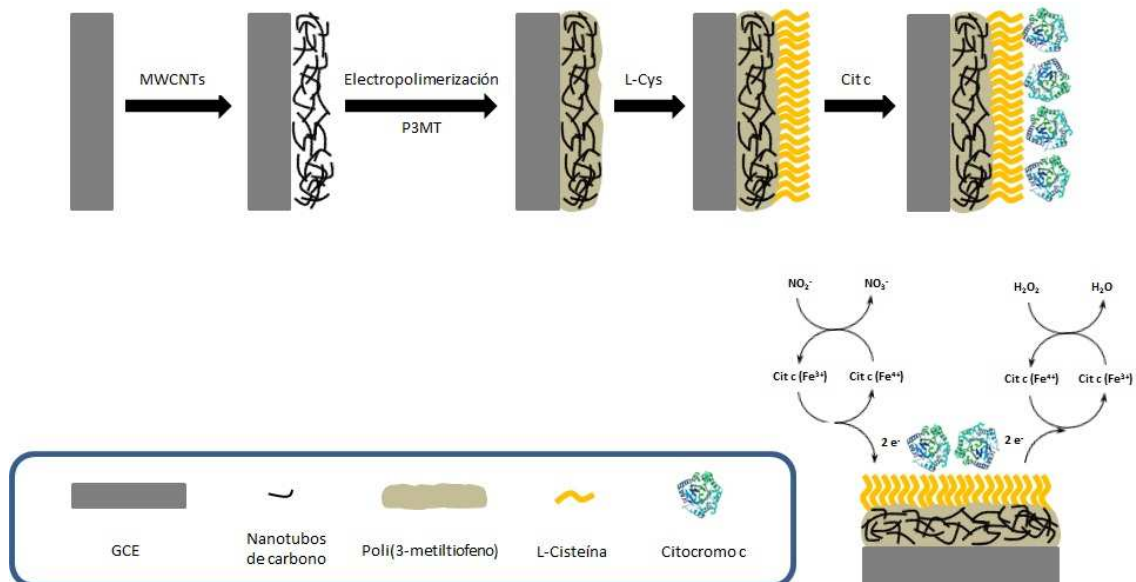


Figura 19. Esquema de la preparación del biosensor de citocromo c basado en el electrodo L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE.

1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

En la *Figura 20* se representa el sistema empleado en los diferentes experimentos electroquímicos. Las medidas amperométricas y voltamperométricas se han realizado empleando un potenciostato BAS 100B, provisto de un soporte BAS C2 EF-1080 y controlado mediante el software de análisis electroquímico BAS 100W versión 2.0. El montaje potenciostático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo de carbono vitrificado (Metrohm 6.084.010, de 3 mm de diámetro), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BAS MF-2063) y un electrodo auxiliar de alambre de Pt (BAS MW-1032), empleándose una célula electroquímica (BAS VC-2) de 10 mL.



Figura 20. a) Potenciostato BAS 100B y b) sistema electródico empleado para las medidas electroquímicas.

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica, voltamperometría diferencial de impulso y amperometría en disoluciones agitadas.

1.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Para obtener las curvas intensidad – potencial se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 10 mL de la disolución de trabajo correspondiente conteniendo H_2O_2 o NaNO_2 en la concentración deseada, y se mantiene con agitación magnética constante hasta el momento en que se procede a la medida. Tras seleccionarse los potenciales inicial, de retorno y final, así como la velocidad de barrido, se procede al registro del voltamperograma cíclico correspondiente con la disolución en reposo.

1.1.3.2. VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

Para obtener los voltamperogramas mediante la técnica diferencial de impulsos se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 10 mL de la disolución de trabajo correspondiente conteniendo NaNO_2 en la concentración deseada. Tras seleccionarse los potenciales inicial y final, así como la velocidad de barrido y la amplitud de impulso, se procede al registro del voltamperograma correspondiente con la disolución en reposo.

1.1.3.3. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

Para obtener los amperogramas, se introducen los tres electrodos en la célula de medida, que contiene 10 mL de la disolución de trabajo correspondiente, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dura el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona la cantidad adecuada de H_2O_2 o NaNO_2 , y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

1.1.4. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La determinación de H_2O_2 se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado. Para ello, el biosensor desarrollado se sumerge en la célula de trabajo que contiene 10 mL de disolución reguladora Tris-HCl 0.05 M de pH 8.0 y se aplica un potencial de 0.0 V (vs. Ag/AgCl), agitando la disolución a velocidad constante. En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta, el volumen deseado de la disolución de H_2O_2 , monitorizándose la intensidad de corriente de la reducción del H_2O_2 , como consecuencia de la actividad peroxidasa del citocromo c, la cual se relaciona con la concentración de H_2O_2 .

1.1.5. DETERMINACIÓN DE NITRITO

La determinación de nitritos se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado. Para ello, el biosensor desarrollado se sumerge en la célula de trabajo que contiene 10 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0 y se aplica un potencial de 0.9 V (vs. Ag/AgCl), agitando la disolución a velocidad constante. En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta, el volumen deseado de la disolución de NaNO₂, monitorizándose la intensidad de corriente de la oxidación del anión nitrito (NO₂⁻), la cual se relaciona con la concentración de NaNO₂.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como antecedentes de este trabajo cabe citar el estudio del comportamiento electroquímico del citocromo c en disolución empleando distintos materiales electródicos. Como ejemplo, en la *Figura 21* se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos por nuestro grupo sobre un electrodo de carbono vitrificado sin modificar y modificado con MWCNTs y con P3MT/MWCNTs [Agüí, 2007]. Como puede observarse, sobre el electrodo modificado con nanotubos de carbono se produce un aumento de la respuesta electroquímica con respecto al electrodo sin modificar, proporcionando intensidades de pico aún mayores la modificación con el material híbrido. Estos resultados demuestran que el electrodo P3MT/MWCNTs/GCE constituye una superficie adecuada para observar la señal debida al par Fe(II)/Fe(III) del grupo hemo del citocromo c.

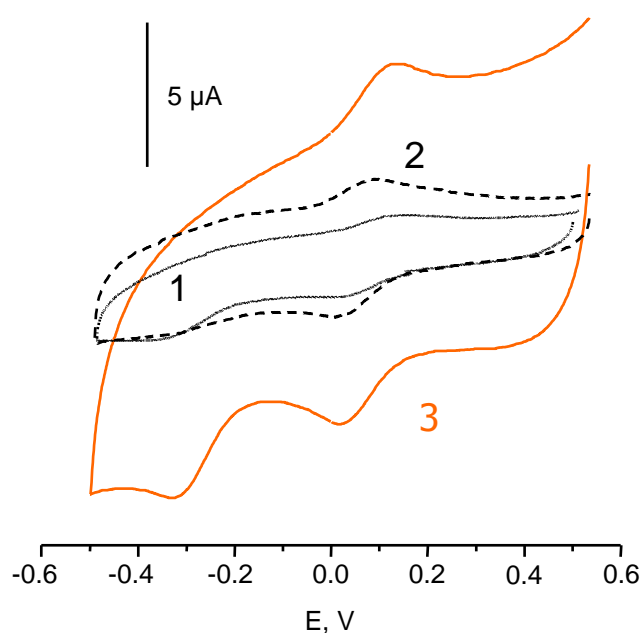


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de citocromo c 0.2 mM sobre: (1) GCE; (2) MWCNTs/GCE; (3) P3MT/MWCNTs/GCE; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ [Agüí, 2007].

1.2.1. INMOVILIZACIÓN Y TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DIRECTA DE CITOCROMO C SOBRE P3MT/MWCNTs

Se han descrito algunos procedimientos de inmovilización de la proteína citocromo c sobre electrodos de diversos materiales, basados en la aplicación de esquemas de electrodeposición [Xiang, 2007] o incubación [Zhang, 2007]_b. Además se han empleado varios tipos de modificadores superficiales, destacando los compuestos con átomos de azufre, como los tioles de cadena corta [Tammeveski, 1998], las monocapas mixtas de ácido mercapto-undecanoico/mercaptundecanol (MUA:MU) [Ge, 2002] y, más recientemente, la cisteína [Liu, 2007]_b, habiéndose demostrado, por ejemplo, que la conjugación L-Cys/Cit c sobre un electrodo de oro ejerce una intensa actividad electrocatalítica para el proceso electroquímico del óxido nítrico, lo que permitió desarrollar un biosensor altamente sensible para este óxido.

En este trabajo se estudió la aplicación de las tres metodologías citadas para conseguir la inmovilización del citocromo c sobre el electrodo P3MT/MWCNTs/GCE. Para ello, en primer lugar se modificó el GCE con el material híbrido de acuerdo con el procedimiento indicado en el *Apartado 1.1.2.1.*, y después se incorporó la proteína siguiendo alguno de los procedimientos que se describen a continuación:

1. Electrodeposición: el método seguido es una modificación del descrito en [Xiang, 2007]. Para aplicarlo, el electrodo híbrido se sumerge en una disolución desoxigenada de citocromo c 0.5 mM en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.0, y se aplican barridos de potencial sucesivos mediante voltamperometría cíclica entre 300 y - 800 mV durante 40 ciclos.
2. Incubación: se sumerge el electrodo P3MT/MWCNTs/GCE durante 14 h en una disolución 0.5 mM de citocromo c preparada en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.0, manteniéndolo en la oscuridad, a temperatura ambiente y sin agitación. Después se lava el electrodo con agua desionizada. Este procedimiento es una modificación del descrito en [Zhang, 2007]_b.
3. Adsorción sobre L-cisteína: la superficie del electrodo P3MT/MWCNTs/GCE se recubre con una capa de L-Cys, aplicando para ello el procedimiento que se

resume en el *Apartado 1.1.2.1*. A continuación se depositan 10 μL de una disolución de citocromo c 0.5 mM preparada en regulador fosfato 0.1 M de pH 7.0, y se deja secar a temperatura ambiente. Después se lava con disolución reguladora fosfato y se deja secar nuevamente. Este procedimiento es una modificación del descrito en [Liu, 2007]_b.

Los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica demostraron que únicamente existía transferencia electrónica directa del citocromo c con la superficie electródica cuando se utilizaba la tercera alternativa de inmovilización. Como ejemplo, en la *Figura 1* del artículo (pág. 32 del mismo) se representó el voltamperograma cíclico obtenido empleando el electrodo L-Cys/P3MT/MWCNT/GCE con citocromo c inmovilizado, comparándose con el obtenido en ausencia de la proteína. Se puede observar la aparición de un par de picos redox correspondientes al grupo hemo Fe(III)/Fe(II) del citocromo c, siendo 0.094V el potencial de pico anódico (E_{pa}) y 0.037 V el potencial de pico catódico (E_{pc}), con una separación de picos de 57 mV. Estos dos picos no aparecen en ausencia de Cit c, lo que indica que el material híbrido P3MT/MWCNTs modificado con L-Cys proporciona un sustrato adecuado para la inmovilización de la proteína, siendo posible observar la reacción electroquímica del par Fe(III)/Fe(II) sobre esta superficie. Se sabe que la conjugación L-Cys/Cit c es muy estable, ya que a pH neutro, el citocromo c posee carga positiva (+8) y puede interactuar fuertemente con las posiciones cargadas negativamente de la L-Cys, adsorbiéndose electrostáticamente. Al mismo tiempo, los grupos carboxilo y amino de la L-Cys interactuarían con los residuos lisina que rodean al grupo hemo del citocromo c. Por otro lado, se ha considerado [Liu, 2007]_b que en este tipo de configuraciones, la L-Cys actúa como un promotor de la transferencia electrónica entre la proteína y el electrodo.

Influencia de la velocidad de barrido de potencial

Con objeto de evaluar el comportamiento electroquímico del citocromo c inmovilizado sobre el electrodo L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE, se estudió la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre su respuesta voltamperométrica en medio PBS 0.1 M de pH 7.0. A partir de datos obtenidos por voltamperometría cíclica, en la

Figura 22 se representó la variación de las corrientes de pico anódico y catódico con la velocidad de barrido en el intervalo de 25 a 500 mV s⁻¹. Como puede observarse, existe una dependencia lineal entre las intensidades de pico y la velocidad de barrido de potencial en el intervalo estudiado, lo que pone de manifiesto el carácter adsorptivo del proceso electroquímico, quedando confirmada la inmovilización estable del citocromo c sobre la superficie electródica modificada.

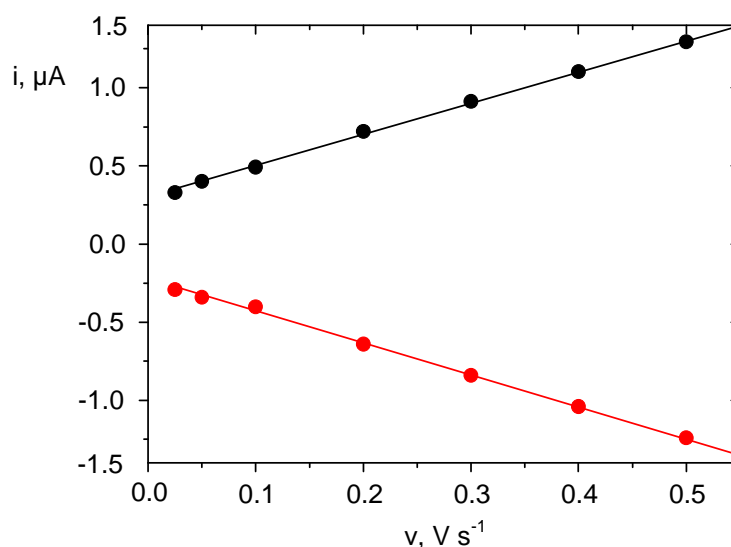


Figura 22. Influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre las corrientes de pico anódico (–) y catódico (–) de los voltamperogramas cíclicos del electrodo Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE en PBS 0.1 M de pH 7.0.

El recubrimiento superficial (Γ) de citocromo c inmovilizado sobre la superficie del electrodo L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE se calculó a partir de la pendiente de la representación i_p vs. v , teniendo en cuenta la ecuación de Laviron:

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

donde “ i_p ” es la corriente de pico, “ n ” es el número de electrones implicados en la transferencia, “ F ” es la constante de Faraday, “ v ” es la velocidad de barrido de potencial, “ Γ ” es el recubrimiento superficial de citocromo c, “ A ” es el área geométrica del electrodo de carbono vitrificado (0.07 cm²), “ R ” es la constante de los gases ideales y “ T ” es la temperatura. El valor obtenido, $(1.6 \pm 0.8) \times 10^{-11}$ mol cm⁻², es diez veces

mayor que el recubrimiento de monocapa teórico ($1.4 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$) [Dickerson, 1971]. Esto puede ser debido a que la L-cisteína inmovilizada sobre el híbrido P3MT/MWCNTs constituye un espacio tridimensional para la inmovilización de la proteína, siendo esta área real de inmovilización de citocromo c mucho mayor que el área geométrica del GCE considerada. Por otro lado, dicho valor está de acuerdo con otros obtenidos para electrodos modificados con nanotubos de carbono y sus híbridos [Shie, 2008; Chen, 2009_a].

Empleando voltamperometría cíclica se estudió también la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre el potencial de los picos de oxidación y de reducción del bioelectrodo Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE observándose en ambos casos el desplazamiento de los picos hacia valores más extremos a medida que aumentaba la velocidad de barrido. Por otro lado, cuando se representó la variación de los potenciales de pico anódico y catódico con el logaritmo de la velocidad de barrido (Figura 23) se observó una relación lineal para $v > 0.15 \text{ V s}^{-1}$.

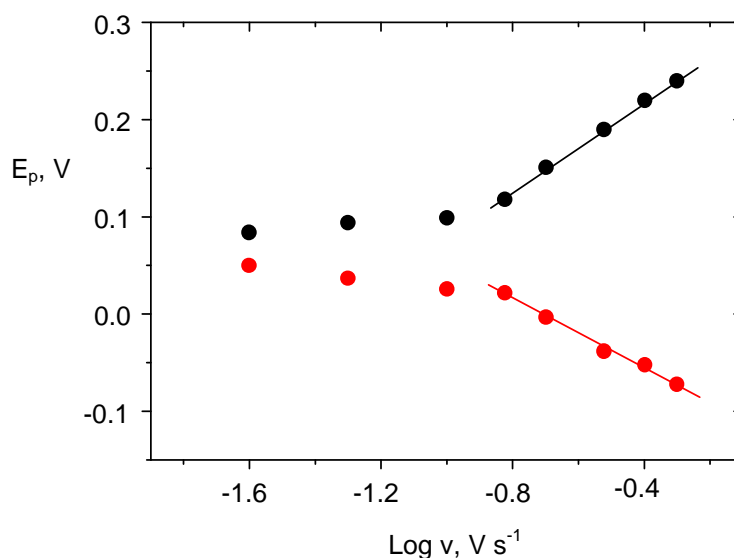


Figura 23. Influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre el potencial de pico anódico (–) y catódico (–) de los voltamperogramas cíclicos del electrodo Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE en PBS 0.1 M de pH 7.0.

De acuerdo con el método de Laviron [Laviron, 1979], la representación gráfica de $E_p=f(\log v)$ da lugar a dos líneas rectas con pendientes iguales a $-2.3RT/\alpha nF$ y $2.3RT/(1-\alpha)$ para los picos anódico y catódico, respectivamente. A partir de dichas pendientes se estimó un valor para el coeficiente de transferencia de carga (α) de 0.51. Teniendo en cuenta este valor, y empleando la ecuación de Laviron para procesos controlados por adsorción:

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log(\alpha) - \log\left(\frac{RT}{nFv}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT}$$

se calculó un valor de la constante de velocidad de transferencia electrónica (k_s) de $0.49 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, que es mayor que el obtenido cuando el citocromo c se inmoviliza sobre películas mesoporosas ordenadas de óxido de niobio (0.28 s^{-1}) [Xu, 2003] y algo inferior aunque del mismo orden que los obtenidos para los electrodos NaY zeolita/GCE (0.78 s^{-1}) [Dai, 2004] y Cit c/DNA/MWCNTs/GCE (0.89 s^{-1}) [Shie, 2008]. Estos resultados confirman de nuevo que el electrodo L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE es una buena plataforma para la inmovilización de citocromo c y la preparación de biosensores con transferencia electrónica directa de la proteína.

1.2.2. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Teniendo en cuenta la actividad pseudoperoxidasa del citocromo c debida a su grupo prostético hemo y con el fin de investigar la bioactividad de la proteína adsorbida, el biosensor desarrollado se aplicó a la detección de peróxido de hidrógeno a través de su reducción catalítica. En la *Figura 1* del artículo (pág. 32 del mismo) se muestran los voltamperogramas obtenidos con el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE después de realizar dos adiciones de H_2O_2 1 mM, observándose el típico proceso de reducción electrocatalítica del H_2O_2 por medio del citocromo c inmovilizado, donde la presencia del sustrato produce un aumento de la corriente de pico catódica y una disminución de la corriente de pico anódica.

1.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad en la determinación de H_2O_2 , se han optimizado las variables que afectan a la preparación y funcionamiento del biosensor

Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE. En primer lugar se preparó el electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono y el polímero conductor aplicando el procedimiento descrito en el *Apartado 1.1.2.1.*, que había sido optimizado previamente [Agüí, 2007].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por nuestro grupo en la preparación del electrodo P3MT/MWCNTs/GCE, la deposición del polímero P3MT sobre la superficie del electrodo MWCNTs/GCE se ha llevado a cabo por electropolimerización del monómero correspondiente, por voltamperometría cíclica, entre 0.0 y + 1.7 V. En la *Figura 24* se muestra la influencia que sobre la señal de oxidación de NADH tiene el número de ciclos de potencial aplicado, observándose un rápido aumento en la intensidad de pico de oxidación a medida que lo hace el número de ciclos hasta un máximo de cinco, apreciándose un descenso en el valor de intensidad de pico cuando el procedimiento se lleva a cabo durante siete ó más ciclos.

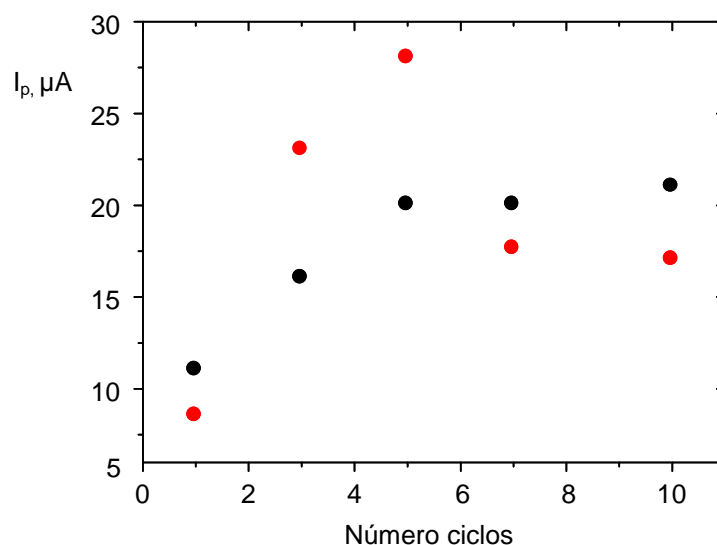


Figura 24. Influencia del número de ciclos efectuados durante el proceso de electropolimerización sobre i_p obtenida mediante voltamperometría cíclica sobre los electrodos P3MT/GCE (●) y P3MT/MWCNTs/GCE (●); NADH 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0.05 M de pH 7.0 [Agüí, 2007].

Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que el incremento en el número de ciclos hace aumentar el grosor de la película de polímero, disminuyendo la contribución electrocatalítica de los nanotubos de carbono en el transporte de electrones [Luo, 2006]. Además, cuando el procedimiento de polimerización se realizó durante cinco o más ciclos se observó una menor estabilidad mecánica y reproducibilidad del electrodo P3MT/MWCNTs/GCE. Finalmente, con el fin de obtener las mejores características en cuanto a sensibilidad y estabilidad mecánica del electrodo modificado, en un tiempo de preparación adecuado, se ha elegido un número de ciclos de 3 como óptimo para llevar a cabo la electropolimerización sobre el electrodo MWCNTs/GCE.

Posteriormente, para la preparación del biosensor de citocromo c, se estudió la influencia de las distintas variables en la incorporación de L-Cys y de citocromo c a la superficie del electrodo P3MT/MWCNTs/GCE. Para ello, el criterio seguido en todos los casos fue la evaluación de la respuesta voltamperométrica del biosensor para la reducción catalítica de H_2O_2 1 mM.

Tiempo de incubación en la disolución de L-Cys

La capa de L-cisteína se incorpora al electrodo por inmersión del mismo en una disolución desoxigenada del aminoácido preparada en agua desionizada, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Con el fin de optimizar esta etapa, se estudió la influencia del tiempo de inmersión, considerando el intervalo comprendido entre 0 y 120 minutos. En la *Figura 25* se muestran los resultados obtenidos por medida de los voltamperogramas registrados para el H_2O_2 en dichas condiciones. Como puede observarse, la modificación del electrodo parece prácticamente completa a los 30 minutos de inmersión, observándose que la señal disminuye para un tiempo de 2 horas, debido probablemente a la incorporación de una cantidad excesiva de L-Cys, que dificulta la transferencia de electrones con la superficie electródica. Por tanto, como compromiso entre la mayor sensibilidad y un tiempo de preparación adecuado, se ha estimado un periodo de 30 minutos para llevar a cabo la modificación con L-cisteína.

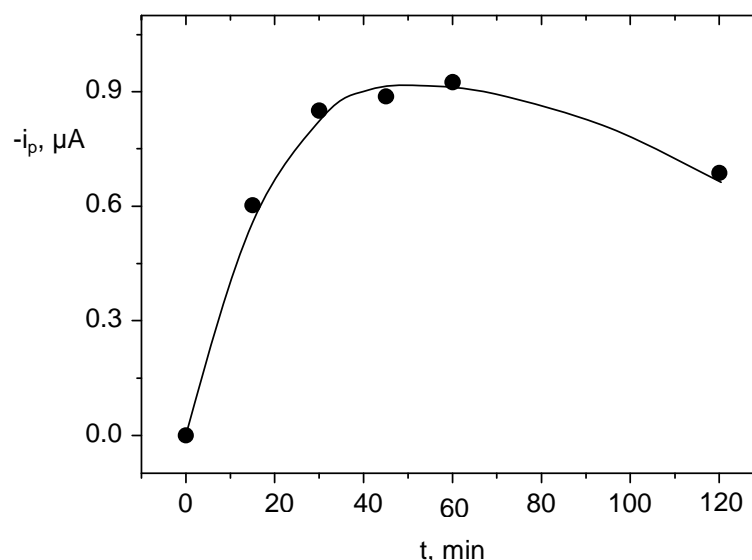


Figura 25. Influencia del tiempo de inmersión del electrodo P3MT/MWCNTs/GCE en L-Cys sobre la respuesta de reducción de H_2O_2 sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE; H_2O_2 1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0.

Medio para la formación de la monocapa de L-Cys

Se estudió la influencia del pH de la disolución de L-cisteína sobre la modificación del electrodo de P3MT/MWCNTs/GCE. Para ello se utilizaron disoluciones acuosas de L-cisteína preparadas en agua desionizada y en los medios reguladores siguientes: $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ 0.1 M de pH 2.0, $H_2PO_4^{2-}/HPO_4^-$ 0.1 M de pH 7.0 y HPO_4^{2-}/PO_4^{3-} 0.1 M de pH 12.0.

En la *Figura 26* puede apreciarse que la mejor respuesta para la reducción de H_2O_2 se obtiene cuando la L-Cys se incorpora en agua desionizada o en una disolución de pH 7.0. Teniendo en cuenta los valores de los pKs de la L-cisteína: $pK_{a1}= 1.71$ ($-NH_2$), $pK_{a2}= 8.33$ ($-COOH$) y $pK_{a3}=10.78$ ($-SH$), puede deducirse que a este pH será la forma "zwitterion" neutra la especie predominante. Se ha visto que estas condiciones favorecen la formación de capas compactas sobre los electrodos del tipo del utilizado en este trabajo, que se establecen por fuertes interacciones de atracción entre las cargas formales positivas de los grupos amino y las cargas formales negativas de los grupos carboxilo [Monterroso-Marco, 2003]. Por el contrario, a pH 2.0, valor muy

próximo a pK_{a1} , y a pH 12.0, las especies predominantes poseen carga positiva o negativa, respectivamente, desapareciendo así las interacciones atractivas entre las moléculas de L-cisteína, lo cual impide la formación de la capa compacta.

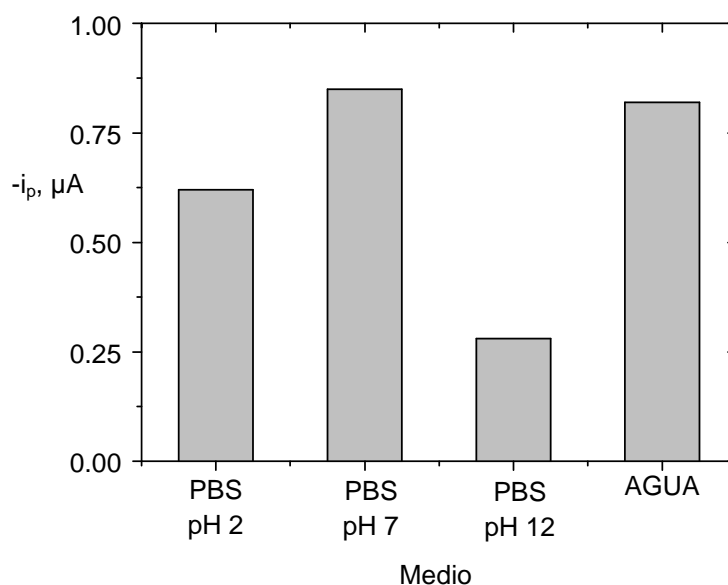


Figura 26. Influencia del medio utilizado para la formación de la monocapa de L-Cys sobre la respuesta de reducción de H_2O_2 sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE; H_2O_2 1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0.

Por otro lado, como ya se ha comentado, cuando se incorpora el citocromo c a la superficie eléctrica modificada con L-Cys, encuentra sitios cargados negativamente que interaccionan con la superficie hidrofílica de esta proteína [Liu, 2007]_b, habiéndose señalado también que los grupos carboxilo y amino de la L-cisteína pueden interaccionar con los residuos lisina que se encuentran alrededor del grupo hemo del citocromo c. De este modo, resulta más favorable trabajar a valores de pH por encima del punto isoeléctrico de la L-Cys ($pI=4.02$). Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos cuando se emplean disoluciones L-cisteína preparadas en agua desionizada y en presencia de regulador fosfato a pH 7.0, se eligió la primera opción por ser la más simple.

Medio para la inmovilización de citocromo c

Se estudió el efecto que sobre la respuesta voltamperométrica del peróxido de hidrógeno ejerce el medio en el que se prepara la disolución de citocromo c. Para ello, se investigaron disoluciones de Cit c preparadas en los medios reguladores siguientes: $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.1 M de pH 2.0, $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}/\text{HPO}_4^-$ 0.1 M de pH 7.0 y $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ 0.1 M de pH 12.0, realizando los experimentos en las condiciones anteriores. En la *Figura 27* se muestran los resultados obtenidos.

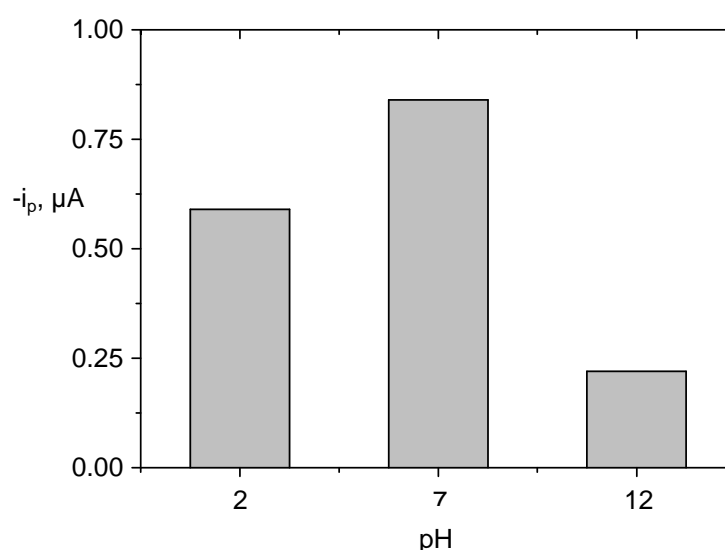


Figura 27. Influencia del medio utilizado para la preparación de la disolución de Cit c sobre la respuesta de reducción de H_2O_2 sobre el biosensor

Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE; H_2O_2 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0.

Como puede observarse, la disolución de Cit c preparada en medio regulador de fosfato de pH 7.0 es la que proporciona las mayores corrientes de reducción del H_2O_2 . Este resultado se atribuye al hecho de que, en estas condiciones, a valores de pH inferiores al punto isoeléctrico ($pI=10.05$), la proteína se encuentra cargada positivamente y queda retenida de forma estable sobre la capa de L-Cys. Sin embargo, a pH 12, esto no ocurre, y a pH 2.0 la corriente de reducción del H_2O_2 es menor debido, probablemente, a que en este medio el citocromo c no es estable, disminuyendo su actividad peroxidasa. Debido a esto, y con objeto de alcanzar la mayor sensibilidad para la detección del peróxido de hidrógeno, para futuros estudios se ha seleccionado

el regulador fosfato de pH 7.0 como medio idóneo para la preparación de la disolución de citocromo c.

Condiciones experimentales para la detección amperométrica de H₂O₂

En primer lugar, a partir de los voltamperogramas cíclicos que aparecen en la *Figura 1* del artículo (pág 32 del mismo), se seleccionó un potencial de 0.0 V para llevar a cabo la detección de H₂O₂ de forma selectiva y sensible. Seguidamente se estudió la influencia del pH del medio sobre la señal amperométrica de H₂O₂ sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE, con los resultados que se muestran en la *Figura 28*.

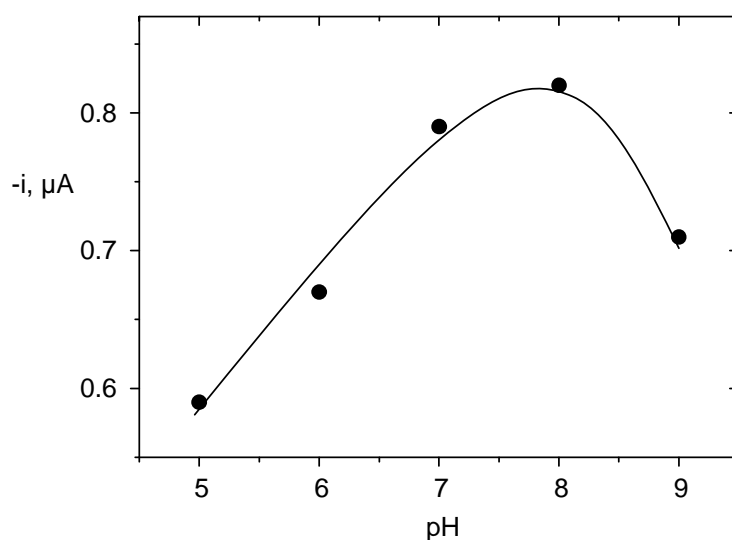


Figura 28. Influencia del pH sobre la respuesta de reducción de H₂O₂ sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE; H₂O₂ 1 mM en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1M; E_{ap}= 0.0 V.

En ella se observa un rápido incremento en la intensidad al aumentar el valor del pH en el intervalo comprendido entre 5.0 y 8.0, así como la disminución de la misma a pH 9.0. Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de alcanzar la máxima sensibilidad, se escogió el valor de pH 8.0 como óptimo para medidas posteriores.

De un modo similar se optimizaron todas las demás variables implicadas en la detección de H₂O₂ sobre el biosensor desarrollado. A modo de resumen, los resultados obtenidos se recogen en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Optimización de variables experimentales para la detección de H₂O₂ sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE.

Electrodo P3MT/MWCNTs/GCE			
Variable	Intervalo	Observaciones	Óptimo
Cantidad de MWCNTs	-	Cantidades elevadas suponen menor estabilidad mecánica	4 µg
P3MT	-	-	3MT 0.05M+NaClO ₄ 0.1M 1) 0.0-1.7 V (3 ciclos) 2) 0.7 V, 600 s
Monocapa de L-cisteína			
Variable	Intervalo	Observaciones	Óptimo
Agitación	Con y sin agitación	No se aprecia ninguna diferencia	Sin agitación
Temperatura	0, 25 y 40 °C	A baja temperatura no se forma la monocapa; las altas temperaturas favorecen la desorción	25 °C
Tiempo de inmersión	0 – 120 min	-	30 min
Medio	PBS de pHs 2, 7 y 12, y agua desionizada	-	Agua desionizada
Concentración	0 – 0.1 M	Concentraciones superiores suponen una dificultad a la transferencia electrónica	0.02 M
Inmovilización de citocromo c			
Variable	Intervalo	Observaciones	Óptimo
Medio	PBS pHs 2, 7 y 12	-	7.0
Concentración	0.05 – 5 mM	Concentraciones superiores suponen un aumento en la corriente capacitiva	0.5 mM
Condiciones de detección amperométrica			
Variable	Intervalo	Observaciones	Óptimo
Potencial de detección	-	-	0.0 V
pH	5.0 – 9.0	-	8.0
Naturaleza del medio regulador	PBS, Britton-Robinson, borato, MES y Tris-HCl	Mayor sensibilidad y mejor relación S/N	Tris-HCl
Concentración del medio regulador	0.001 – 0.2 M	Garantiza la mejor capacidad reguladora y conductora del medio	0.05 M

1.2.2.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE H₂O₂

Una vez optimizadas las variables experimentales y aplicando un potencial de detección de 0.0 V, se procedió a construir la curva de calibrado y a establecer las características analíticas del método. La curva de calibrado para la determinación de H₂O₂ se construyó en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.7 y 1000 μM y se muestra en la *Figura 29a*. A modo de ejemplo, en la *Figura 29b* se han representado algunas de las señales amperométricas registradas para adiciones de H₂O₂ 20 μM.

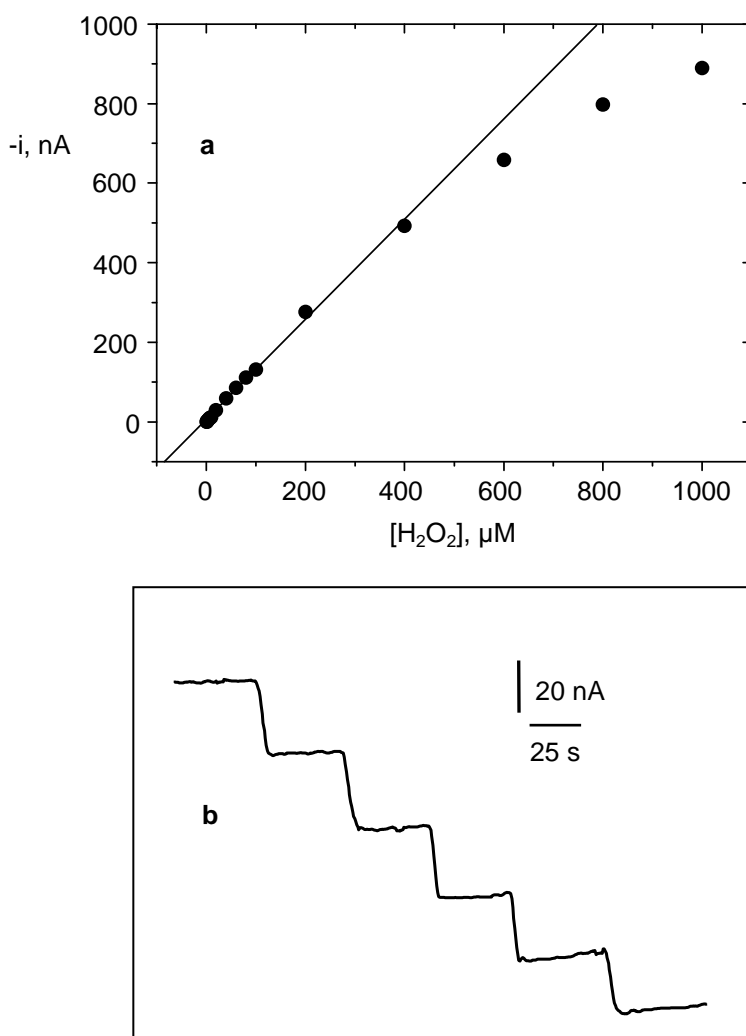


Figura 29. (a) Calibrado para la detección amperométrica de H₂O₂ sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE y (b) señales amperométricas para la adición de H₂O₂ 20 μM.

Se obtuvo un intervalo lineal ($r=0.998$) comprendido entre 0.7 y 400 μM de H_2O_2 , con una pendiente de $1.26 \pm 0.02 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $-4 \pm 3 \text{ nA}$. El límite de detección se calculó con el criterio $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado respectivo, y s_b es la desviación estándar de diez medidas de H_2O_2 0.7 μM . El valor obtenido fue 0.23 μM , el cual es aproximadamente un orden de magnitud menor al obtenido con un electrodo Cit c/MWCNTs/GCE (1.02 μM) [Zhao, 2005], a pesar de aplicarse un potencial de detección 200 mV menos negativo. Esta mejora en el límite de detección está de acuerdo con el efecto sinérgico esperado debido a la presencia conjunta del polímero conductor electrónico y los nanotubos de carbono. Finalmente se evaluó la precisión del método realizando 10 medidas de H_2O_2 20 μM (punto intermedio del calibrado), obteniéndose un valor de RSD del 4.7% que indica un buen nivel de precisión.

Parámetros cinéticos

Un aspecto importante en la preparación de electrodos basados en citocromo c es el cálculo de los parámetros cinéticos de la reacción que tiene lugar en presencia de H_2O_2 . En este sentido, la constante de Michaelis aparente, K_M^{ap} , es directa e inversamente proporcional a las constantes de disociación y de formación del complejo enzima-sustrato, respectivamente, siendo un parámetro que da idea de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Para llevar a cabo dicho cálculo, en este trabajo se comprobó primeramente el ajuste de la respuesta del biosensor a una cinética tipo Michaelis-Menten, determinando el parámetro "x" de la representación de Hill ($[\log(i_{\text{max}}/i)-1]$ vs. $\log[\text{H}_2\text{O}_2]$), que resultó ser prácticamente igual a la unidad ($x=0.97$). Teniendo en cuenta los datos experimentales obtenidos se calculó el valor de K_M^{ap} a partir de la representación de Lineaweaver-Burk [Kamin, 1980], haciendo uso de la ecuación:

$$\frac{1}{i} = \left(\frac{1}{i_{\text{max}}} \right) + \left(\frac{K_M^{\text{ap}}}{i_{\text{max}}} \right) \times \frac{1}{c}$$

donde i es la corriente en estado estacionario medida a 0.0 V, i_{max} es la máxima corriente bajo condiciones de saturación de sustrato y c es la concentración de H_2O_2 .

Para la gráfica representada en la *Figura 30* se deduce un valor para $K_M^{ap} = 451 \mu\text{M}$. Este valor es menor que los estimados para otros biosensores de H_2O_2 basados en citocromo c encontrados en la bibliografía: $470 \mu\text{M}$ [Xu, 2007]_b, 1.2 mM [Feng, 2005], $857 \mu\text{M}$ [Zhao, 2005], $791 \mu\text{M}$ [Xiang, 2007], quedando así demostrada la buena actividad que presenta el citocromo c hacia el peróxido de hidrógeno cuando se inmoviliza sobre el sensor desarrollado L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE.

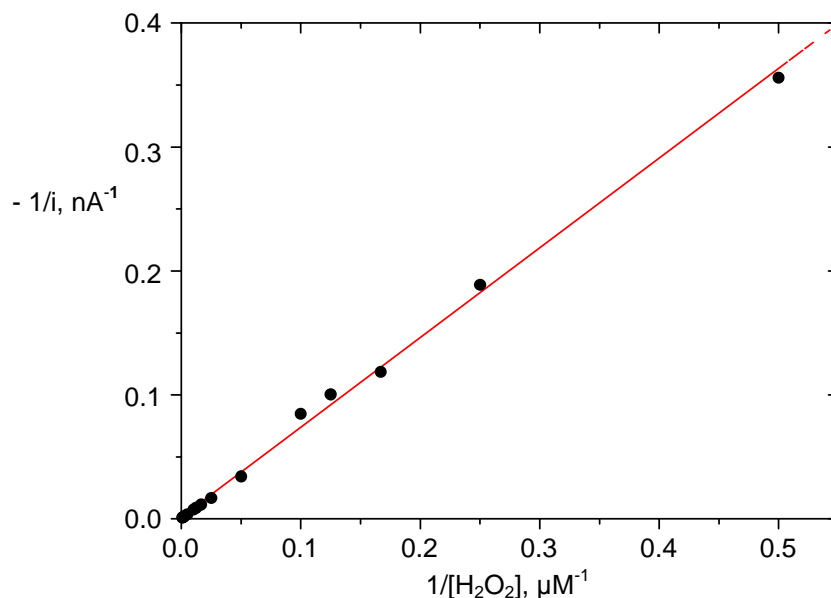


Figura 30. Representación correspondiente a la linealización de Lineaweaver-Burk.

1.2.2.3. ESTABILIDAD

Uno de los aspectos más importantes que hay que estudiar cuando se desarrolla un biosensor electroquímico es su estabilidad, es decir, es necesario evaluar su utilización con un respuesta reproducible entre medidas. La estabilidad de la respuesta es un factor crítico a la hora de determinar las posibilidades de selección de un biosensor para aplicaciones en control de procesos y monitorizaciones rutinarias. Por ello, este es uno de los aspectos más importantes a investigar cuando se desarrolla un biosensor electroquímico.

En este trabajo, para llevar a cabo este estudio, se evaluaron diferentes aspectos relacionados con la repetibilidad, la reproducibilidad y el tiempo de vida del biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/ MWCNTs/GCE. Los valores de la desviación estándar relativa (RSD)

obtenidos a partir de las medidas sucesivas (n=10) de disoluciones de H₂O₂ 0.01 mM realizadas con un mismo biosensor, y de cinco disoluciones de H₂O₂ 0.01 mM realizadas con cinco biosensores diferentes preparados simultáneamente de la misma manera, fueron del 3.1% y el 8.1 %, respectivamente, resultados que indican una buena repetibilidad de las medidas y una buena reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor.

Por otro lado, el tiempo de vida del biosensor se evaluó realizando con el mismo tres medidas diarias de una disolución de H₂O₂ 0.01 mM. Se estudiaron las condiciones más apropiadas para almacenar el biosensor en los periodos entre medidas: a) en seco y a temperatura ambiente, b) en seco a 4 °C, y c) en disolución reguladora fosfato de pH 7 a 4 °C, encontrándose los mejores resultados en este último caso. En la *Figura 2* del artículo (pág. 33 del mismo) aparece representado el gráfico de control obtenido en estas condiciones, que muestra los valores medios de las tres medidas realizadas cada día. Los límites de control superior e inferior fueron calculados como $\pm 3s$ de los valores obtenidos para el primer día de medida (n=5). Como puede observarse, la respuesta del biosensor se mantiene dentro de los límites de control durante los ocho primeros días, observándose una ligera disminución de la señal entre los días 8 y 12. Asimismo en la *Tabla 5* se resumen los resultados obtenidos para las tres condiciones de almacenamiento ensayadas. En dicha Tabla, además de indicarse el número de días en los que se realiza la medida, también se incluye el número de días que transcurre desde el primer día de medida hasta que la respuesta de los biosensores está fuera de los límites de control.

Tabla 5. Optimización de variables experimentales para la detección de H₂O₂ sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE.

Condición de almacenamiento	Días de medida	Días de vida
Seco a T amb.	1	1
PBS pH 7 a T amb.	3	3
PBS pH 7 a 4 °C	8	15

1.2.2.4. INTERFERENCIAS

Empleando las condiciones de detección previamente optimizadas, se estudió el efecto que ejerce sobre los valores de la intensidad de corriente, la presencia de otras especies consideradas como posibles interferentes en la detección de H_2O_2 sobre los biosensores enzimáticos usuales. Las especies elegidas fueron: ácido úrico (UA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), dimetilsulfóxido (DMSO), dopamina (DA), catecol, ácido homovaníllinico (HVA), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA), acetaminofeno (A) y ácido ascórbico (AA). En la *Figura 31* se muestran las respuestas amperométricas registradas a 0 mV para las especies seleccionadas junto con la del H_2O_2 , todos ellos a una concentración 10 μ M.

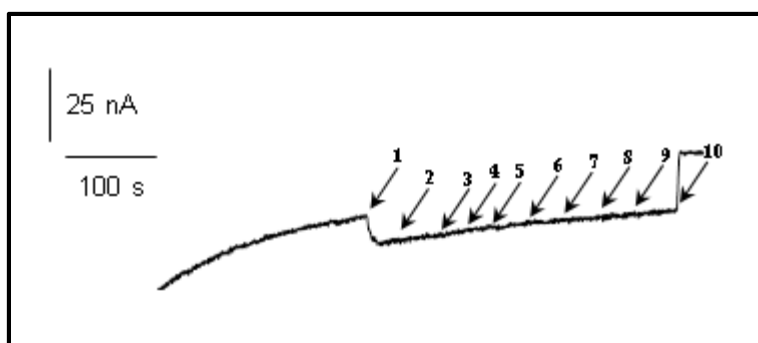


Figura 31. Señales amperométricas obtenidas sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE de disoluciones 10 μ M de: 1) H_2O_2 ; 2) UA; 3) DOPAC; 4) DMSO; 5) DA; 6) catecol; 7) HVA; 8) 5-HIAA; 9) A, y 10) AA. $E_{op}=0$ mV.

Como puede apreciarse, al nivel de concentraciones estudiado y al potencial de detección utilizado, 0 mV, sólo el ácido ascórbico proporcionó una señal amperométrica sobre la superficie del electrodo, siendo ésta de oxidación. Cuando se evaluó la respuesta del biosensor para disoluciones mezcla de H_2O_2 :AA, en las que se mantenía constante la concentración del primero y se variaba la de ácido ascórbico, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de errores relativos superiores al 15% en la determinación de H_2O_2 para relaciones molares H_2O_2 :AA inferiores a 10:1. Con el fin de minimizar la fuerte interferencia de este ácido en la medida de la señal del peróxido de hidrógeno, se estudió la posibilidad de recubrir la superficie del biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE con una película de Nafion. Este procedimiento es habitual en la preparación de este tipo de biosensores

electroquímicos, y en él se aprovecha la naturaleza polianiónica de este polímero que, a través de repulsiones electrostáticas, impide la difusión a su través de sustancias aniónicas, que es la forma en que se encuentra el ácido ascórbico al pH de medida [Yang, 2006]_b. Para ilustrar esta capacidad, en la *Figura 32* se muestra las respuesta amperométrica obtenida para adiciones de H₂O₂ y ácido ascórbico, ambos en concentración 10 μM, cuando se emplea un electrodo Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE modificado con una película de Nafion. Tal como puede observarse en dicha Figura, en las condiciones experimentales utilizadas, el ácido ascórbico prácticamente no exhibe respuesta amperométrica alguna al potencial de detección empleado.

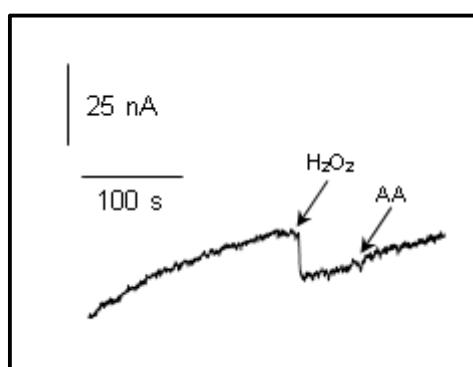


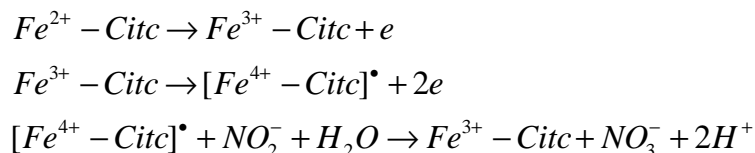
Figura 32. Señales amperométricas obtenidas sobre el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE modificado con Nafion de disoluciones 10 μM de H₂O₂ y AA.

1.2.3. DETERMINACIÓN DE NITRITO

Aunque la aplicación más evidente de los biosensores de citocromo c es la detección de peróxido de hidrógeno, actualmente se investigan otras posibilidades de interés analítico, como es el caso de la determinación del radical superóxido [Cortina-Puig, 2009] o del anión nitrito [Chen, 2009]_a, que es la que se abordó en este trabajo.

La determinación de nitrito es necesaria, sobre todo en el campo de los alimentos, debido a su toxicidad potencial, ya que este anión puede interactuar con las aminos dando lugar a la formación de nitrosaminas, altamente tóxicas y carcinogénicas [Konstantinou, 2006]. Aunque se han desarrollado diversos métodos para su determinación, el empleo de un biosensor electroquímico supone una alternativa simple, selectiva y sensible para la detección "in situ" de esta especie en muestras reales de diferente grado de complejidad.

El mecanismo en el que se basa la detección de nitrito con un biosensor de citocromo c implica la oxidación biocatalítica del anión, según el esquema de reacciones que se muestra a continuación [Geng, 2008]:



Cuando se utiliza un biosensor electroquímico, primero el citocromo c es oxidado a su estado Fe(III) a un potencial moderado. Después, a un potencial más alto, se produce la oxidación al radical $[Fe^{4+} - Citc]^{\bullet}$, que es inestable y altamente reactivo, pudiendo dar lugar a la oxidación del nitrito a nitrato.

En la *Figura 3a* del artículo (pág. 34 del mismo) se muestran los voltamperogramas cíclicos, registrados con sustracción de fondo, obtenidos con el biosensor Cit c/L-Cys/P3MT/MWCNTs/GCE en disoluciones de PBS de pH 7 que contenían dos concentraciones distintas de nitrito. Como puede observarse, a un potencial de +0.78 V se observa un pico de oxidación que aumenta con la concentración del anión. Este pico se atribuye a la generación electroquímica del radical, que es la especie que reacciona con el anión nitrito de acuerdo con la reacción descrita anteriormente. Además, en la *Figura 3b* del artículo se muestran los resultados obtenidos por voltamperometría diferencial de impulsos, en los que se observa nuevamente la aparición de un pico bien definido cuya intensidad depende de la concentración de nitrito.

Para demostrar la posibilidad de llevar a cabo la determinación de nitrito empleando el biosensor desarrollado, se aplicó la técnica de amperometría en disolución agitada, escogiéndose, a partir de los voltamperogramas cíclicos obtenidos anteriormente, un potencial de detección de +0.9 V y el mismo medio, PBS de pH 7.0 [Chen, 2009]_a, utilizado para su registro. En la *Figura 4a* del artículo (pág. 34 del mismo) se muestra el amperograma obtenido para adiciones sucesivas de NO_2^- 10 μ M, que permite observar la rapidez de respuesta del biosensor, con un tiempo de 6 s hasta alcanzar el estado estacionario. Por otro lado, en la *Figura 4b* del artículo se

muestra el calibrado obtenido para la determinación de nitrito, con un intervalo lineal comprendido entre 10 y 100 μM ($r=0.9996$) y un valor de la pendiente de $(7.04 \pm 0.07) \cdot 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$. La sensibilidad obtenida es, por ejemplo, tres veces superior a la que proporciona un electrodo $\text{SiO}_2/\text{Cit c}/\text{SiO}_2/\text{BDD}$ utilizando el mismo potencial de detección [Geng, 2008]. Además se obtuvo un límite de detección, calculado con el criterio $S/N=3$, igual a 0.5 μM , que es un valor más bajo que, por ejemplo, el obtenido con un electrodo de mioglobina/ ZnO /grafito (4 μM) [Zhao, 2006] y con un electrodo de hemoglobina/oro coloidal/ TiO_2 /GCE (1.2 μM) [Yang, 2005]_b.

BIOSENSOR DE LACTATO DESHIDROGENASA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(3-METILTIOFENO)

2

El ácido láctico o, en su forma ionizada, el lactato, es un metabolito que puede encontrarse en casi todos los organismos vivos y, de forma natural o artificial, en muchos alimentos. Así la detección de lactato ha sido muy importante en diferentes ámbitos como son la medicina deportiva, el diagnóstico clínico y la industria alimentaria [Yang, 2008]_b. Es un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el grupo adyacente al grupo carboxilo (Figura 33), lo que lo convierte en un ácido hidroxílico. Posee un carbono asimétrico en posición "α", por lo que existe en dos formas de isómeros ópticos: el dextrógiro, ácido D-láctico, y el levógiro, ácido L-láctico, de mayor importancia biológica.

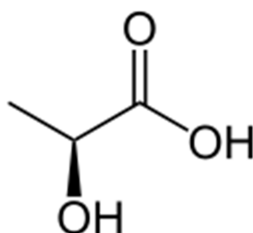


Figura 33. Estructura química del ácido láctico.

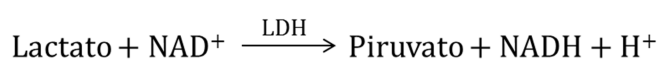
El ácido láctico se encuentra en bebidas y alimentos como cerveza, vino, leche, yogures, queso, mantequilla, vegetales, carnes y pescados, en los que es producido por las bacterias lácticas. En la industria alimentaria, el lactato es indicador de procesos de fermentación relacionados con la frescura, estabilidad y calidad de almacenamiento de productos como vinos y otras bebidas alcohólicas [Smutok, 2005], leche y sus

derivados [Serra, 1999], y alimentos que contienen sales de lactato o el ácido libre empleado como aditivo para estabilizar el pH, como pueden ser salsas de tomate, frutas y zumos.

En la industria del vino, el seguimiento de la fermentación maloláctica se lleva a cabo por monitorización del descenso de la concentración de ácido L-málico y el aumento del ácido L-láctico. Esta conversión contribuye a una disminución de la acidez y a la suavidad del vino, pudiendo tener tres orígenes: por levaduras durante el transcurso de la fermentación alcohólica de los azúcares; por las bacterias durante el transcurso de la fermentación maloláctica o por fermentación láctica de los azúcares, de glicerol, del ácido tartárico u otros componentes ácidos en los vinos enfermos, pudiendo ser indicativo de su deterioro [Nikolaus, 2008].

Entre los métodos analíticos convencionales para la determinación de ácido láctico destacan los espectrofotométricos [Nanjo, 2006] y cromatográficos [Fukushima, 1999; Hasegawa, 2003]. Sin embargo, la mayoría de estos métodos son complejos, lentos y conllevan un difícil tratamiento de muestra. También se han desarrollado métodos enzimáticos basados en un esquema de reacciones acopladas en las que participan la lactato oxidasa o la lactato deshidrogenasa, midiéndose la absorbancia debida a la formación de peróxido de hidrógeno o de NADH como productos de reacción [Girotti, 2000].

Una alternativa a los métodos convencionales para la detección de ácido láctico es el empleo de biosensores, que proporcionan medidas rápidas, simples y directas. Para el desarrollo de estos dispositivos se han empleado principalmente las enzimas lactato oxidasa (LOx) y lactato deshidrogenasa (LDH). En este último caso, la enzima LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato en presencia de NAD^+ , y el NADH producido en la reacción enzimática se detecta sobre la superficie electródica, de acuerdo con las siguientes reacciones:



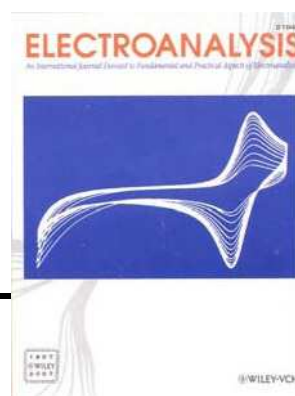
En este trabajo se preparó un biosensor de lactato deshidrogenasa basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con un material híbrido de nanotubos de carbono y poli-(3-metiltiofeno). La enzima LDH se inmovilizó sobre la superficie del electrodo MWCNTs/P3MT/GCE por adsorción, obteniéndose buenos resultados en términos de sensibilidad. Además el biosensor desarrollado se aplicó a la determinación de lactato en vino.

A continuación se muestra la publicación resultante de este trabajo para, posteriormente, comentar sus aspectos más relevantes, así como aquellos estudios que no se incluyen en el artículo.

Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on an Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode

Lourdes Agüí, Marcos Eguílaz, Carlos Peña-Farfal, Paloma Yáñez-Sedeño, José M. Pingarrón

Electroanalysis



Vol. 21 pp. 386-391, 2009

Full Paper

Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on a Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode

L. Agüí,^a M. Eguílaz,^a C. Peña-Farfal,^b P. Yáñez-Sedeño,^a J. M. Pingarrón^{a*}

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

^b Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Chile

*e-mail: pingarro@quim.ucm.es

Received: July 19, 2008

Accepted: September 10, 2008

Abstract

A lactate biosensor constructed by immobilization of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) on a glassy carbon electrode modified with a hybrid material composed of the conducting polymer poly (3-methylthiophene) (P3 MT), electrodeposited on the electrode surface, and multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs), is reported. The excellent characteristics of the electrode modified with the hybrid material toward the electrochemical oxidation of NADH allowed the construction of a robust LDH electrochemical biosensor able to operate at a working potential as low as +300 mV without the need for redox mediator. Experimental variables affecting the performance of the biosensor: amount of LDH immobilized on the modified electrode surface, buffer composition and working pH value, MWCNTs loading in the hybrid material and NAD⁺ concentration were optimized. Under the optimized conditions, a linear calibration graph for lactate was obtained over the $1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-4}$ M ($r = 0.9993$) concentration range, with a detection limit of 5.6×10^{-7} M. The biosensor design showed good repeatability of the measurements, good reproducibility in the inter-biosensor assays and a good selectivity against other organic acids, especially when the biosensor is coated with a Nafion film.

Keywords: Carbon nanotubes, Poly(3-methylthiophene), LDH, Lactate

DOI: 10.1002/elan.200804404

1. Introduction

The construction of electrochemical biosensors using conducting polymers has been widely exploited in last years because electropolymerization demonstrated to be an appropriate methodology for the preparation of suitable immobilization matrices for biomolecules [1]. Moreover, the use of nanomaterials for the construction of biosensing devices constitutes one of the most exciting approaches in modern electroanalytical chemistry as a consequence of the unique properties of these nanomaterials [2]. In this context, carbon nanotubes (CNTs) are playing an increasingly significant role in the preparation of improved electrochemical sensing devices [3]. Hybrid materials consisting of CNTs and conducting polymer composites exhibit special properties due to the synergic effect from the individual components. Recently, a poly(3-methylthiophene) (P3 MT)/multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) hybrid composite synthesized onto a glassy carbon electrode (GCE) showed an improved voltammetric response toward the NADH electrochemical oxidation process with respect to those obtained at a GCE modified either with CNTs or with the conducting polymer separately. The synergic effect observed with the hybrid material-modified electrode was attributed to the fact that the conducting polymer can immobilize and connect MWCNTs, while the presence of MWCNTs can interact with the polymer forming aggregates

able to reduce the ion intercalation distance, which facilitates charge transfer and increases the conductivity of the polymeric film [4].

Various designs of lactate dehydrogenase (LDH) electrochemical biosensors based on the use of CNTs-modified electrodes have been reported recently in the literature. An amperometric biosensor in which LDH was immobilized onto MWCNTs together with Meldola's blue (MB) has been recently described [5]. Electrocatalysis of the enzymatically generated NADH by MB was the basis of the amperometric response. Moreover, a composite of MWCNTs and chitosan was also used as a matrix for the entrapment of LDH onto a GCE [6]. The authors claim that the presence of MWCNTs produces the raise of the current responses, a decrease in the electrooxidation potential of NADH and the prevention of the electrode surface fouling. Screen-printed electrodes modified with Variamine blue (VB), covalently attached to oxidized single-walled carbon nanotubes (SWCNTs-COOH), were used as sensors for the detection of NADH and of L-lactic acid after immobilization of NADH [7]. Chronoamperometry was employed to assay the activity of LDH on a GCE modified by a SWCNT-film [8]. The analysis of the experimental results revealed that the presence of SWCNTs markedly increased the activity of LDH.

The remarkable advantages offered by the hybrid material composed of P3 MT and MWCNTs toward the electrochemical oxidation of NADH have been profited in this

work to develop a lactate biosensor in which the enzyme LDH was immobilized onto a MWCNTs-P3 MT-GCE. Lactate is an important analyte in several fields such as clinical diagnosis, industrial fermentation processes and food quality control [9]. The excellent behaviour of the hybrid material for both the immobilization of the enzyme and the transduction of the electrochemical signal should allow a biosensor design with a high simplicity, low operating potential and high sensitivity without the need for a redox mediator.

2. Experimental

2.1. Apparatus and Electrodes

Electrochemical measurements were carried out with a BAS (West Lafayette, IN, USA) 100B potentiostat provided with a BAS C2 EF-1080 cell stand. A Metrohm 6.084.010 glassy carbon electrode (\varnothing 3 mm) modified with poly-(3-methylthiophene) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) was used as working electrode. The reference electrode was a BAS MF 2063 Ag/AgCl 3 M electrode and a BAS MW-1032 Pt wire was used as the auxiliary electrode. Moreover, BAS VC-2 10 mL electrochemical cells were also used.

2.2. Reagents and Solutions

Stock 1.0×10^{-2} M NADH (Sigma, 98%) solutions were prepared by dissolving the product in 0.05 M phosphate buffer of pH 7.0. Stock 0.10 M 3-methylthiophene (Aldrich, 99%) and 0.2 M sodium perchlorate (Sigma, 99%) solutions were prepared in pure acetonitrile (HPLC grade, Scharlau). Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs, \varnothing 30 ± 15 nm) with 95% purity were supplied from NanoLab (Brighton, MA), and used without any pre-treatment. Stock 0.100 M lactic acid (lithium salt, Sigma, 97%) solutions were prepared in 0.10 M phosphate buffer of pH 7.4. More dilute solutions were prepared with the same buffer solution. Stock 0.10 M ascorbic acid (Fluka, 99.5%), malic acid (Merck, 99.5%), acetic acid (Panreac, 99.5%), tartaric acid (Sigma, 99%), citric acid (Panreac 98%), and 2.0×10^{-3} M uric acid (Sigma, 99%) solutions were also prepared in the same buffer medium to carry out interference studies. 0.10 M ethanol (Scharlau, 99.8%) solutions were prepared for the same purpose.

Lactate dehydrogenase (LDH) solution type II (Sigma) from rabbit muscle 50 KU/4.08 mL was employed.

A 0.05 M phosphate buffer of pH 8.0 was used as supporting electrolyte. Other solvents and chemicals used were of analytical reagent grade and water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

2.3. Preparation of the Biosensor

Before modification, the glassy carbon electrode was polished with 0.3 μ m alumina (Metrohm) slurries, rinsed

thoroughly with double distilled water, sonicated 30 s into water and 30 s into acetone, and dried in air. Next, the electrode was immersed into a 0.05 M monomer (3 MT) solution prepared in acetonitrile containing 0.1 M sodium perchlorate. Electropolymerization was performed by applying five successive cyclic voltammograms between 0.0 and +1.7 V versus Ag/AgCl at 20 mV s^{-1} . Next, the electrode was maintained at +0.7 V during 600 s and then, ten successive cycles into phosphate buffer solution of pH 7.0 were performed.

Two milligrams of MWCNTs were dispersed with the aid of ultrasonic stirring during 45 min in 5 mL of an aqueous 0.1% Nafion solution. A 10- μ L aliquot of this dispersion was dropped on the P3 MT-GC electrode surface and the solvent was evaporated under an IR lamp at room temperature.

Lactate dehydrogenase was deposited onto the MWCNT-P3 MT-GCE by dropping 10 μ L (9.6 units) from an enzyme solution in 0.10 M phosphate buffer of pH 7.4. The biosensor was kept under darkness until the solvent was evaporated.

2.4. Determination of Lactate in Wine

Red wine (Cabernet Sauvignon from Chile) was purchased in a local supermarket. 1.0 mL of filtrated wine was diluted with 1.0 mL of 0.10 M phosphate buffer of pH 8.0. An aliquot of 100 μ L of this solution was transferred to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer (pH 8.0) and 2.0×10^{-3} MNAD⁺. After applying a detection potential of +300 mV to the bioelectrode and allowing the baseline to be stabilized, the lactate content was determined by amperometry in stirred solutions using the standard additions method, this implying additions of 50 μ L of a 0.01 M lactic acid solution to the cell. The results were compared with those obtained by applying an HPLC reference method [10].

3. Results and Discussion

3.1. Construction of the Hybrid Material-Based LDH Biosensor

Amperometric biosensors based on the use of LDH imply catalytic conversion of lactate to pyruvate in the presence of NAD⁺, according to the following reaction:



The NADH produced in the enzyme reaction can be monitored by its electrochemical oxidation at the surface of a properly modified electrode [6]:



In a previous work, a P3 MT-MWCNTs-GCE was prepared by depositing MWCNTs on the GC electrode and further electropolymerization of P3 MT onto the MWCNTs-GCE by cyclic voltammetry [4]. When NADH was immobilized onto this modified electrode by following the procedure described in the Experimental section, no amperometric signal was obtained at +400 mV when successive additions of lactic acid to a solution containing NAD^+ were carried out. However, if the hybrid modified electrode was prepared by electropolymerizing P3 MT firstly onto the GCE, and then by depositing the appropriate amount of MWCNTs, further immobilization of LDH permitted good amperometric signals to be obtained at the same applied potential. This fact suggested that the deposition of the enzyme directly onto the polymer surface could block the ions entrance into the polymer network thus preventing its conducting role. However, when CNTs were deposited onto the electropolymerized film, this harmful effect was not produced.

Figure 1 displays the cyclic voltammogram recorded at a MWCNTs-P3 MT-GCE from 1.0×10^{-3} M NADH in phosphate buffer of pH 7.4. As it can be seen, a NADH oxidation current significantly different from that the background current was observed from +200 mV. Since one of the goals of the development of biosensor designs without the use of redox mediators is to be able to operate at potential values at which interferences from electroactive substances are minimized, the possibility of operating at low potential values (300–400 mV) was explored for the LDH biosensor. As it is described in the Experimental section, the enzyme was immobilized onto the electrode modified with the hybrid material by simple drop casting on the electrode surface and therefore merely by adsorption on the CNTs agglomerate, thus providing a simple and compact biosensor design suitable for practical purposes. Considering that, in principle, this simple immobilization protocol could affect the stability of the biosensor, some other enzyme immobilization methods, including a BSA film as well as cross-linking with glutaraldehyde, were checked. Amperograms obtained for 5.0×10^{-5} M lactate at +400 mV exhibited much lower steady-state currents than that obtained at the

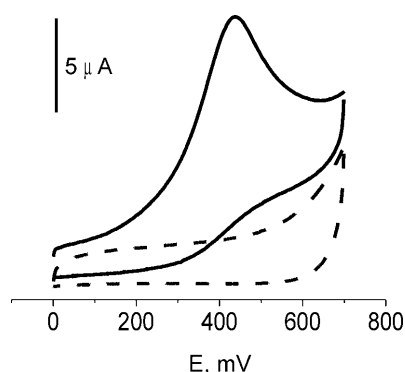


Fig. 1. Cyclic voltammogram for 1.0×10^{-3} M NADH recorded at a MWCNT-P3 MT-GCE; (---) background voltammogram from a 0.05 M PBS of pH 7.4; $\nu = 25$ mV s^{-1} .

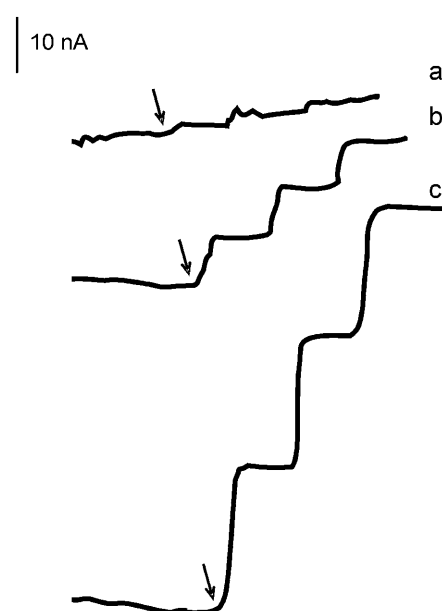


Fig. 2. Current-time recordings obtained at a) +200 mV, b) +300 mV, and c) +400 mV recorded at a LDH-MWCNT-P3 MT-GCE for 5.0×10^{-5} M lactate additions (shown by arrows) in 0.05 M PBS of pH 7.4 containing 5.0×10^{-3} M NAD^+ .

same applied potential with the enzyme immobilized by drop casting. Nevertheless, this simple immobilization scheme did not affect dramatically the biosensor stability as it will be discussed below.

Figure 2 shows current-time recordings obtained at different applied potential values with a LDH-MWCNT-P3 MT-GCE for a lactate concentration of 5.0×10^{-5} M in a buffer solution containing 5.0×10^{-3} M NAD^+ . As it can be seen, although larger steady-state currents were obtained for potential values of +400 mV, easily measurable responses were obtained yet at +300 mV, thus demonstrating the possibility of using this biosensor for analytical purposes at this low operating potential.

3.2. Optimization of Biosensor Working Conditions

The influence of experimental variables that could affect the performance of the biosensor: amount of LDH immobilized on the modified electrode, buffer composition and working pH value, MWCNTs loading in the hybrid material and NAD^+ concentration, were investigated in order to optimize the electroanalytical characteristics of the amperometric detection. In order to obtain larger amperometric signals and, accordingly, more precise current measurements, all these optimization studies were carried out by applying a working potential of +400 mV to the bioelectrode.

Current-time recordings obtained after additions of 5.0×10^{-5} M lactic acid to a 0.1 M phosphate buffer solution of pH 7.4 containing 5.0×10^{-3} M NAD^+ exhibited an increase in the steady-state current upon immobilization of 1 to 10 units of LDH. However, the current decreased for

higher enzyme loadings which can be attributed to a hindering of the electron transfer for such a high biomolecule coatings. Therefore, 10 LDH units were chosen as enzyme loading for further work.

Britton–Robinson, boric acid/sodium borate, morpholine ethanesulfonic acid (MES), TRIS and phosphate buffer solutions of pH 8.0 at a 0.1 M concentration were tested as working solutions for the LDH biosensor. The most appropriate amperometric signals were obtained for phosphate buffer. Moreover, pH changes between 5.0 and 9.0 showed that the highest sensitivity was achieved at pH 8.0 (data not shown). Accordingly, these solution working conditions were employed for further studies.

The amount of MWCNTs deposited onto the conducting polymer film was also optimized. Figure 3 displays the effect of the CNTs loading on the steady-state current measured for 5.0×10^{-5} M lactic acid in a phosphate buffer solution containing 5×10^{-3} M NAD^+ . As expected, the current increased with the CNTs loading until reaching a maximum for 4–6 μg . However, a much higher amount of CNTs produced a sharp decrease in the current suggesting that the formation of a too thick nanotubes film prevented communication between the enzyme and the electrode substrate.

Finally, the NAD^+ concentration in solution was also evaluated. As it is well known, a large excess of NAD^+ with respect to the enzyme substrate is necessary to ensure that the response is proportional to the analyte concentration. Nevertheless, if this cofactor excess is too big an undesirable inhibitory effect could occur [11]. Figure 4 shows as the current measured for 5.0×10^{-5} M lactic acid exhibited a sharp rise with NAD^+ concentration until at least an excess of 10 times was reached. Then, the current increased more moderately with higher NAD^+ concentrations until reaching a maximum for a 50-fold excess. A slight current decrease was observed for a 100-fold excess which was attributed to the above mentioned slight inhibitory effect at such a high concentration level. Therefore, this 50-fold excess NAD^+ in solution was selected to establish the analytical characteristics of the developed biosensor.

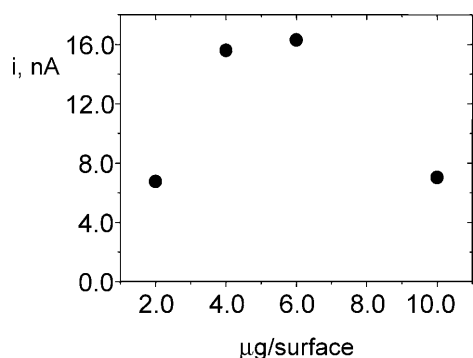


Fig. 3. Effect of the MWCNTs loading on the steady-state current measured with different LDH-MWCNT-P3 MT-GCE for 5.0×10^{-5} M lactate in 0.05 M PBS of pH 8.0 containing 5.0×10^{-3} M NAD^+ . $E_{\text{app}} = +400$ mV.

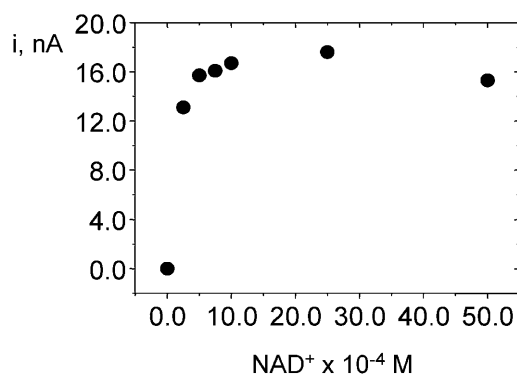


Fig. 4. Effect of the NAD^+ concentration on the steady-state current measured with different LDH-MWCNT-P3 MT-GCE for 5.0×10^{-5} M lactate in 0.05 M PBS of pH 8.0. $E_{\text{app}} = +400$ mV.

3.3. Analytical Characteristics and Biosensor Performance

Under the above mentioned conditions and using $+300$ mV as detection potential, a linear calibration graph for lactate was obtained over the 1.0×10^{-6} – 5.0×10^{-4} M ($r = 0.9993$) concentration range, with a slope of $(6.38 \pm 0.09) \times 10^4$ nA/M and an intercept of 0.26 ± 0.06 nA. A limit of detection of 5.6×10^{-7} M was calculated according to the $3s_b/m$ criterion, where m is the slope of the calibration graph, and s_b is the standard deviation ($n = 10$) of the signals for blank solutions. Also, a limit of determination of 1.8×10^{-6} M was calculated according to the $10 \times$ standard deviation criterion. When these analytical characteristics are compared with those achieved with other designs of LDH electrochemical biosensors based on the use of CNTs-modified electrodes reported recently [5–7], it can be deduced that this biosensor design allows the application of operating potentials close to those used by biosensor involving redox mediators. In spite of the absence of mediator, the range of linearity obtained is wider and the limit of detection achieved is around one order of magnitude lower than those obtained with biosensors using Meldola blue or Variamine blue as mediators (7.5 and 1 μM , respectively). Moreover, when the LDH-MWCNT-P3 MT-GCE is compared with a MWCNT-Chitosan-LDH-GCE operating at $+600$ mV, the range of linearity is wider and the detection limit is similar (0.24 μM) in spite of the much lower detection potential used.

Furthermore, if this comparison is made with respect to LDH biosensors constructed from electrodes modified with other conducting polymers [12, 13], it can be deduced that biosensors prepared with polypyrrole-poly(vinyl) sulfonate and polyaniline allowed the use of detection potentials around $+200$ mV, but the detection limits obtained were much higher (100 and 50 μM , respectively) than that achieved with the biosensor based on the use of the hybrid material reported in this work.

A relative standard deviation of 5.7% was calculated for repetitive amperometric measurements of different 1.0×10^{-5} M lactate solutions ($n = 8$) carried out with the same

biosensor. The stability of the biosensor was checked by performing daily at least three measurements from different 5.0×10^{-5} M lactate solutions. When not in use, the biosensor was stored in phosphate buffer at 4 °C. Figure 5 shows that the mean values of the measurements performed everyday remained inside the control limits, set at $\pm 3 \times$ standard deviation of the mean value obtained for the first day, during 15 days. This can be considered as a quite good stability of the biosensor taking into account the simple enzyme immobilization procedure employed, and compares advantageously with that reported for other LDH electrochemical biosensor designs [6]. Moreover, the reproducibility of the amperometric signals for the same lactate concentration obtained with different biosensors constructed in the same manner was also evaluated. A RSD value of 7.4% was calculated ($n = 5$), thus demonstrating the reproducibility in the biosensor construction procedure. Finally, the time to reach baseline stabilization at the applied potential was about 5 min, and therefore this is the time needed to carry out the first amperometric measurement. However, subsequent measurements of the steady-state current obtained after successive lactate additions took no longer than approximately 5 seconds, which is an advantage versus the long response times (40–90 s) obtained when LDH is entrapped in polyaniline or polypyrrole-polyvinyl-sulfonate films [6].

On the other hand, an interference study was carried out by checking the effect of the presence of different organic acids: tartaric acid, maleic acid, acetic acid, citric acid, uric acid and ascorbic acid, as well as methanol, which may be present together with lactic acid in real samples. Under the same experimental conditions used for lactate determination, only uric acid and acetic acid showed significant amperometric responses at +300 mV. These interferences could be dramatically reduced by casting a Nafion film on the bioelectrode. So, the interference from uric acid was decreased in a 92% and the interference from ascorbic acid in a 87% when 5 μ L of a 5% Nafion solution were deposited onto the biosensor surface and let to dry at room temper-

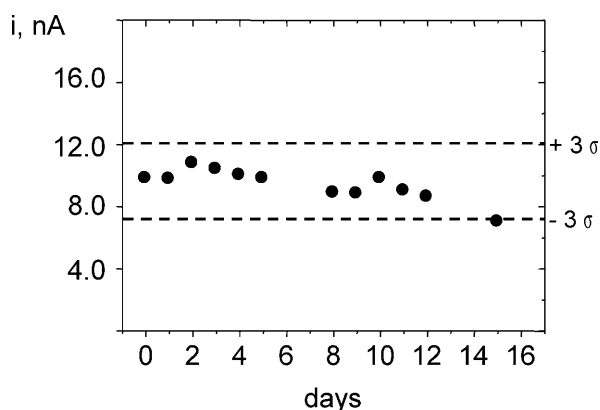


Fig. 5. Control chart constructed for a LDH-MWCNT-P3 MT-GCE. Data show the mean values of three measurements from different 5.0×10^{-5} M lactate in 0.05 M PBS of pH 8.0. $E_{app} = +300$ mV.

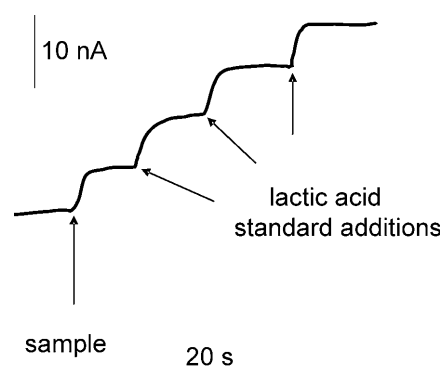


Fig. 6. Current–time recordings obtained at +300 mV with a LDH-MWCNT-P3 MT-GCE for successive additions of lactic acid to the red wine sample. Other conditions as in Figure 4.

ature under darkness. However, the presence of the Nafion film did not affect apparently the lactate response. So, the currents measured ($n = 5$) for 5.0×10^{-5} M lactate were 8 ± 1 nA and 9 ± 1 nA without and with the Nafion film, respectively.

3.4. Determination of Lactate in Wine

The developed LDH-MWCNTs-P3 MT-GCE was applied to the determination of lactic acid in red wine. One of the most interesting characteristics of the usefulness of the developed biosensor for this type of analysis is the simplicity of the sample treatment required. As described in section 2.4, only a 1:1 dilution with the phosphate buffer was needed before transferring the sample to the electrochemical cell. In order to minimize matrix effect, the determination was accomplished by applying the standard additions method. As an example, Figure 6 shows a series of recorded amperograms after successive additions of 50 μ L of a 0.01 M lactic acid solution to the cell. Results obtained by triplicate yielded a mean value of 30 ± 4 mM. These results were compared with those provided by using a reference method employing HPLC with UV detection at 210 nm [10], 28.3 ± 0.1 mM. No significant differences between the results obtained by both methods were found at the 0.05 significance level by applying the Student's *t* test, thus indicating the suitability of the developed LDH biosensor for the reliable analysis of lactic acid in wines.

4. Conclusions

The possibility of constructing dehydrogenase-based electrochemical biosensors using as the transducer element a hybrid material composed of MWCNTs and a conducting polymer such as P3 MT, has been demonstrated by developing a lactate biosensor as a proof of concept. The synergic effect that the hybrid material possesses toward the electrocatalytic oxidation of NADH allows the bioelectrode to operate at low potential values without the need for using

redox mediators in the biosensor design, and without a loss of analytical performance, as it is demonstrated when this performance is compared with other LDH biosensors constructed with either CNTs or conducting polymers. The advantageous methodology implying the use of the hybrid composite as the transducer can be easily extended to other types of electrochemical biosensors.

5. Acknowledgements

Financial support from The Ministerio de Educación y Ciencia (Projects CTQ2006-02905 and CTQ2006-02743), and AECI D/011642/07 is gratefully acknowledged. Dr. C. Peña also acknowledge financial support from FONDECYT11070056-DIUC208071062.

6. References

- [1] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH, New York, **2006**, pp. 146.
- [2] E. Katz, I. Willner, J. Wang, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 19.
- [3] L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *622*, 11.
- [4] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 7946.
- [5] A. C. Pereira, M. R. Aguiar, A. Kisner, D. V. Macedo, L. T. Kubota, *Sens. Actuators B* **2007**, *124*, 269.
- [6] Y.-C. Tsai, S.-Y. Chen, H.-W. Liaw, *Sens. Actuators B* **2007**, *125*, 474.
- [7] A. Radoi, D. Compagnone, M. A. Valcárcel, P. Placidi, S. Materazzi, D. Moscone, G. Palleschi, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 2161.
- [8] Z.-H. Gan, Q. Zhao, Z.-N. Gu, Q.-K. Zhuang, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 239.
- [9] B. Serra, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, *Application of Electrochemical Enzyme Biosensors in Food Quality Control*, in *Electrochemical Sensor Analysis*, Vol. 49 (Eds: S. Alegret, A. Merkoçi), Elsevier, Amsterdam **2007**, pp. 253–296.
- [10] OIV (2004). *Methodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts*, Office International de la Vigne et du Vin, Paris **2004**.
- [11] Q. Wu, M. Maskus, F. Pariente, F. Tobalina, V. M. Fernández, E. Lorenzo, H. D. Abruña, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3688.
- [12] A. Chaubey, M. Gerard, R. Singhal, V. S. Singh, B. D. Malhotra, *Electrochim. Acta* **2001**, *46*, 723.
- [13] A. Chaubey, K. K. Pande, V. S. Singh, B. D. Malhotra, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, 97.

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución patrón de 3-metiltiofeno 0.1 M: se prepara por pesada directa de 0.4909 g de monómero 3-metiltiofeno (3MT) (Aldrich) y posterior dilución con acetonitrilo (CH_3CN) (Scharlau) hasta un volumen final de 50 mL.
- Disolución patrón de perclorato sódico 0.2 M: se disuelven 1.224 g de perclorato sódico (NaClO_4) (Sigma) en 50 mL de acetonitrilo (Scharlau).
- Disolución de Nafion al 0.1 % (p/p): se prepara por dilución de 0.2 mL de Nafion 5% (p/p) (Aldrich) en 10 mL de agua desionizada.
- Dispersión de nanotubos de carbono 0.4 mg mL⁻¹: se prepara a partir de 2 mg de MWCNTs (Nanolab, de 30 ± 15 nm de diámetro) en 5 mL de Nafion al 0.1% por agitación mediante ultrasonidos durante 45 minutos.
- Disolución de Lactato deshidrogenasa (LDH) 12.25 U μL^{-1} : suministrada en suspensión en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.2 M de pH 6.0 (tipo II, from Rabbit Muscle EC 1.1.1.27, Sigma). Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4.
- Disolución patrón de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) 0.01 M: se disuelven 35.5 mg de NADH (Sigma) en 5 mL de disolución reguladora adecuada.
- Disolución patrón de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) 0.1 M: se disuelven 66.3 mg de NAD⁺ (Sigma) en 1 mL de disolución reguladora adecuada.
- Disolución de ácido láctico 0.1 M: se disuelven 9.6 mg de ácido láctico (sal de Litio, Sigma) en 1 mL de disolución reguladora adecuada. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.

- Disoluciones patrón de compuestos interferentes: se disuelve la cantidad adecuada de cada compuesto en 1 mL de disolución reguladora. Se han preparado disoluciones de ácido ascórbico (Fluka), ácido acético (Panreac), ácido cítrico (Panreac), ácido tartárico (Sigma), ácido málico (Merck) y metanol (Scharlau), todas ellos en concentración 0.1 M, y ácido úrico (Sigma) en concentración 2 mM. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disoluciones reguladoras 0.1 M: se han preparado disoluciones reguladoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, Tris-HCl, Britton-Robinson, $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{BO}_2^-$ y ácido 4-morfolinoetanosulfónico, disolviendo la cantidad adecuada de los reactivos en agua desionizada. El pH se ajusta al valor adecuado con NaOH 2 M o HCl 4 M, según corresponda.
- Disolución de trabajo para la determinación de lactato: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.05 M de pH 8.0, conteniendo la cantidad adecuada de NAD^+ para que la concentración final sea 2.5 mM.

2.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

2.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(3-METILTIOFENO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (MWCNTs/P3MT/GCE)

El procedimiento seguido para la preparación de este electrodo es muy similar al descrito en el *Apartado 1.1.2.1.*, y puede describirse, brevemente, a través de las siguientes etapas:

Pretratamiento del electrodo:

En primer lugar, con el fin de obtener una superficie limpia y reproducible, se realiza el acondicionamiento del electrodo de carbono vitrificado como se ha descrito en el *Apartado 1.1.2.1.*

Electrodeposición del polímero conductor:

Una vez aplicado el pretratamiento de limpieza anterior, se procede a la incorporación de poli(3–metiltiofeno) (P3MT) por electrodeposición. Para ello, se sumerge el electrodo en una disolución, previamente desoxigenada, que contiene el monómero 3–metiltiofeno (3MT) en concentración 0.05 M y perclorato sódico (NaClO_4) en concentración 0.1 M, ambos en acetonitrilo (CH_3CN). La electropolimerización se lleva a cabo en una célula electroquímica que contiene el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar de alambre de Pt, aplicando cinco ciclos sucesivos mediante voltamperometría cíclica entre 0 y 1.7 V a 20 mV s^{-1} .

Acondicionamiento del electrodo modificado:

Una vez completados los ciclos, con el fin de acondicionar el electrodo P3MT/GCE, se lleva a cabo el mismo procedimiento detallado en el *Apartado 1.1.2.1*.

Recubrimiento con MWCNTs:

Finalmente, la superficie del electrodo P3MT/GCE se recubre con una alícuota de 10 μL de una dispersión de nanotubos de carbono (0.4 mg mL^{-1}), y posteriormente se evapora el disolvente bajo una lámpara de radiación IR.

2.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA

A continuación, una vez preparado el electrodo, se procede a inmovilizar la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) sobre su superficie.

Sobre la superficie del electrodo MWCNTs/P3MT/GCE se deposita una alícuota de 10 μL de una disolución de lactato deshidrogenasa de $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4, y se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se aclara con agua destilada y se almacena en disolución reguladora de fosfato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso, dejando esperar un tiempo para que el biosensor alcance la temperatura ambiente antes de realizar las medidas electroquímicas.

En la *Figura 34* se muestra el esquema seguido para la preparación del biosensor de lactato deshidrogenasa, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato de la lactato deshidrogenasa.

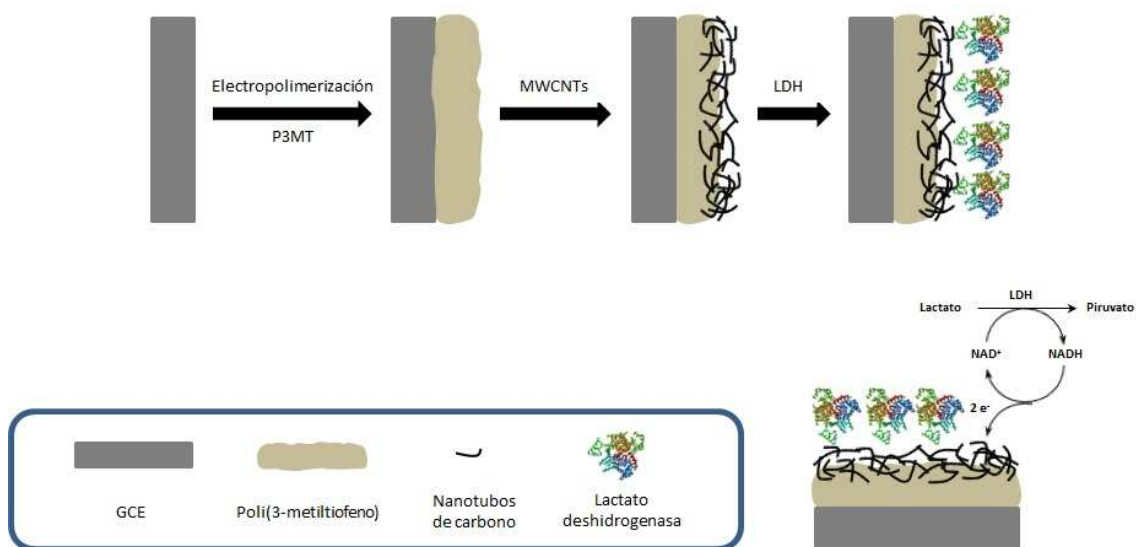


Figura 34. Esquema de la preparación del biosensor de lactato deshidrogenasa basado en el electrodo MWCNTs/P3MT/GCE.

2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Las medidas amperométricas y voltamperométricas se han realizado empleando un potenciostato BAS 100B, provisto de un soporte BAS C2 EF-1080 y controlado mediante el software de análisis electroquímico BAS 100W versión 2.0. El montaje potencioestático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo de carbono vitrificado (Metrohm 6.084.010, de 3 mm de diámetro), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BAS MF-2063) y un electrodo auxiliar de alambre de Pt (BAS MW-1032), empleándose una célula electroquímica (BAS VC-2) de 10 mL.

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica y amperometría en disoluciones agitadas.

2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Para obtener las curvas intensidad – potencial se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 10 mL de la disolución reguladora conteniendo

NADH en la concentración deseada, y se mantiene con agitación magnética constante hasta el momento en que se procede a la medida. Tras seleccionarse los potenciales inicial, de retorno y final, así como la velocidad de barrido, se procede al registro del voltamperograma cíclico correspondiente con la disolución en reposo.

2.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

Para obtener los amperogramas, se introducen los tres electrodos en la célula de medida, que contiene 10 mL de la disolución de trabajo, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dura el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona la cantidad adecuada de ácido láctico, y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

2.1.4. DETERMINACIÓN DE LACTATO EN VINO

El biosensor desarrollado se ha empleado para la determinación de este compuesto en muestras de vino tinto procedentes de Chile (*Cabernet Sauvignon*, *Cinsault* y *Carmenere*).

2.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para la determinación de lactato en vino por amperometría en disoluciones agitadas empleando el biosensor desarrollado, 1 mL de la muestra, previamente filtrada para la eliminación de partículas en suspensión, se diluye con 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 8.0.

2.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

La determinación de lactato se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado y, con el fin de minimizar el efecto matriz, empleando el método de adiciones estándar. Para ello, el biosensor desarrollado se sumerge en la célula de trabajo que contiene 10 mL de disolución reguladora de

fosfato de pH 8.0 conteniendo NAD^+ 2.5 mM y se aplica un potencial de + 0.3 V (vs. Ag/AgCl), agitando mecánicamente a velocidad constante.

En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta, una alícuota de 50 μL de la disolución de muestra diluida (preparada como se indica en el *Apartado 2.1.4.1.*) a la célula de medida. A continuación se realizan adiciones sucesivas de alícuotas de 50 μL de una disolución patrón de ácido láctico 0.01 M, monitorizándose la intensidad de corriente de oxidación del NADH, generado en la reacción enzimática que se produce en la superficie del electrodo, la cual se relaciona con la concentración de lactato presente en la muestra.

2.1.4.3. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

La validación de los resultados obtenidos por la metodología electroquímica se ha realizado mediante comparación de los que resultan de aplicar un método cromatográfico oficial de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (OENO 33/2204). Las muestras de vino, previamente filtradas, son directamente analizadas mediante HPLC con detección UV. En la *Tabla 6* se resumen las condiciones de trabajo empleadas.

Tabla 6. *Condiciones de trabajo para HPLC-UV.*

Cromatografo HPLC:

- Autosampler: Merck Hitachi L-2200
- Bomba: Merck Hitachi L-2130 Elite-Lachrom
- Precolumna: RP-18, 15 cm; 4.6 mm, 5 μ (Institut Heidger, Alemania).
- Columna: Sulfonil-estireno-divinilbenceno, S-DVB, 25 cm; 4.6 mm ID.
- Fase móvil: H_2SO_4 0.01 N (isocrático).
- Flujo: 0.5 mL/min.
- Temperatura: 70° C.
- Volumen de muestra inyectada: 5 μL .

Detector Merck-Hitachi L-2400:

- Longitud de onda: 210 nm
-
-

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como antecedentes de este trabajo cabe citar las excelentes propiedades electrocatalíticas que demostró un electrodo basado en un material híbrido de nanotubos de carbono y poli(3-metil-tiofeno) hacia la oxidación de NADH [Agüí, 2007]. A modo de ejemplo, en la *Figura 35* se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos por nuestro grupo de investigación cuando se emplean los electrodos GCE, P3MT/GCE, MWCNTs/GCE y P3MT/MWCNTs, observándose un efecto sinérgico intenso cuando se emplea el material híbrido, con respecto al de los componentes individuales.

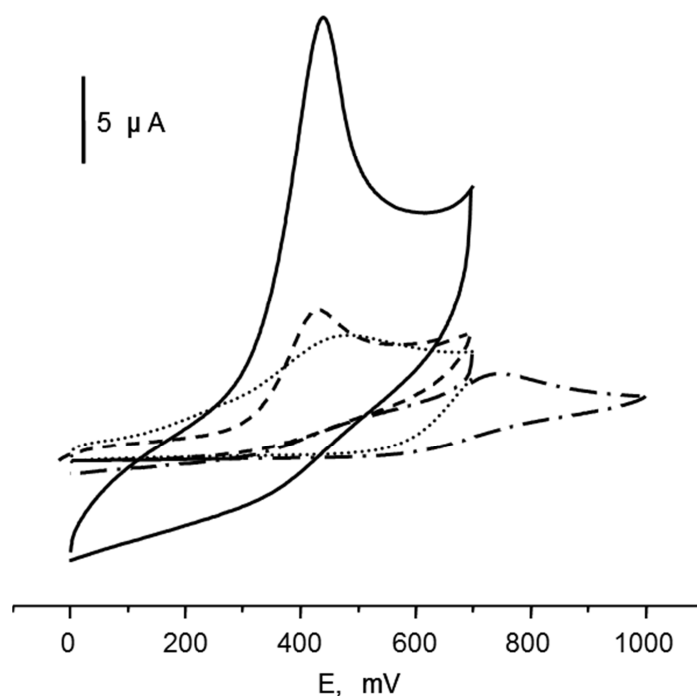


Figura 35. Voltamperogramas cíclicos de NADH 1 mM sobre: GCE (- · -); P3MT/GCE (- · - ·); MWCNTs/GCE (· · ·); P3MT/MWCNTs/GCE (—); $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ [Agüí, 2007].

2.2.1. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR LDH/MWCNTs/P3MT/GCE

Los buenos resultados obtenidos para la medida de la respuesta de oxidación de NADH empleando el material híbrido P3MT/MWCNTs hace de éste un material adecuado para la preparación de biosensores basados en enzimas deshidrogenasas.

Los biosensores electroquímicos con enzimas deshidrogenasas basados en la detección de NADH proporcionan una elevada sensibilidad y bajos límites de detección. Sin embargo, uno de los mayores problemas que conlleva la determinación de NADH es el elevado sobrepotencial de oxidación que presenta esta especie cuando se utilizan superficies electródicas convencionales [Zhang, 2005]. En los últimos años, los electrodos basados en nanotubos de carbono han demostrado su capacidad para reducir el valor del potencial de detección para la oxidación electroquímica de NADH [Wang, 2003]. Además, otros materiales, como los polímeros conductores electrónicos, incluido el poli-(3-metiltiofeno) también han demostrado actividad electrocatalítica hacia este proceso de oxidación, habiendo sido empleados para la preparación de electrodos modificados que demuestran al mismo tiempo un menor ensuciamiento superficial [Jaraba, 1998].

Como ya se ha comentado, en un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación [Agüí, 2007], el electrodo híbrido P3MT/MWCNTs/GCE demostró un comportamiento excelente hacia la oxidación de NADH debido al efecto sinérgico originado por la presencia de ambos componentes. Por otro lado, en el capítulo anterior se ha demostrado que dicha superficie es apropiada para la preparación de un biosensor de citocromo c. Es por ello por lo que, con el fin de poner a punto un método sensible y selectivo para la determinación de lactato, se escogió esta configuración basada en el material híbrido P3MT/MWCNTs para inmovilizar la enzima LDH.

En primer lugar se investigaron las dos alternativas posibles de modificación del electrodo con ambos componentes, es decir, la ya ensayada previamente, consistente en electrodepositar el polímero P3MT sobre el electrodo modificado con los nanotubos de carbono [Agüí, 2007], y la basada en la electrodeposición del polímero P3MT sobre la superficie del electrodo seguida de la deposición de un pequeño

volumen de la suspensión de nanotubos de carbono. En ambos casos, la enzima LDH se depositaba posteriormente sobre el electrodo modificado. Una vez preparados los biosensores, se registraron las señales amperométricas de oxidación del NADH generado en la reacción enzimática, por adición de ácido láctico 0.05 mM en presencia de NAD^+ 5 mM, aplicando un potencial de +0.4 V. En la *Figura 36* se muestran los resultados obtenidos, que se comparan con los de otras configuraciones.

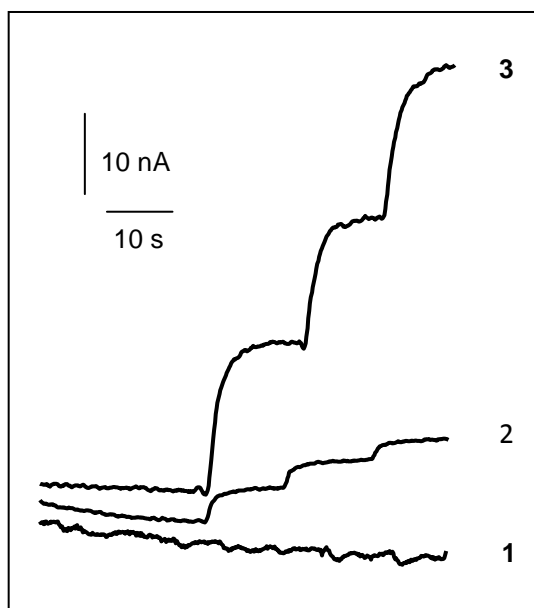


Figura 36. Señales amperométricas obtenidas empleando los biosensores:
 1) LDH/P3MT/MWCNTs/GCE; 2) LDH/MWCNTs/GCE y 3) LDH/MWCNTs/P3MT/GCE;
 ácido láctico 0.05 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.05 M de pH 7.4 conteniendo
 NAD^+ 5 mM; $E_{ap} = +0.4$ V.

Como puede observarse, únicamente aparecen corrientes apreciables cuando la LDH se deposita sobre los nanotubos de carbono (curvas 2 y 3), siendo la configuración LDH/MWCNTs/P3MT/GCE (curva 3) la que exhibe las respuestas de mayor magnitud. En la Figura también se aprecia la ausencia de respuesta cuando se utiliza la configuración LDH/P3MT/MWCNTs/GCE (curva 1), a pesar de que en el trabajo anterior, el electrodo P3MT/MWCNTs/GCE fue empleado con buenos resultados para preparar el biosensor de Cit c. El hecho de que en este caso la misma superficie electródica no sea apropiada para inmovilizar la enzima LDH se debe probablemente a

que la deposición de la enzima sobre la superficie del P3MT impide la entrada de iones hacia la estructura del polímero, imposibilitando que éste pueda encontrarse en su forma conductora. En el biosensor de citocromo c esto no ocurría ya que la inmovilización se realizaba a través de una capa de L-cisteína, cargada negativamente, que actuaba como promotor electrónico. Por otro lado, el P3MT debe sintetizarse necesariamente en medio orgánico (acetonitrilo), por lo que no ha sido posible preparar el biosensor por atrapamiento de la enzima durante la etapa de electropolimerización, lo que habría permitido investigar con mayor profundidad este fenómeno. Como ejemplo del buen comportamiento del electrodo MWCNTs/P3MT/GCE en la detección del NADH, en la *Figura 1* del artículo (pág. 388 del mismo) se muestra, comparado con la señal del electrólito fondo, un voltamperograma cíclico de una disolución de NADH 1 mM sobre dicho electrodo, en el que se observa cómo es posible medir la oxidación de este compuesto a partir de un potencial de +0.2 V.

2.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Todas las variables implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE fueron optimizadas con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad en la determinación de ácido láctico. Para ello, todos los estudios de optimización se realizaron aplicando un potencial de detección de +0.4 V, describiéndose a continuación los resultados obtenidos.

Preparación del electrodo MWCNTs/P3MT/GCE

Como se indica en el *Apartado 2.1.2.1.*, el electrodo de carbono vitrificado se modificó primero por electrodeposición de una disolución del monómero 3-metiltiofeno 0.05 M en acetonitrilo y en presencia de perclorato sódico 0.1 M, realizando cinco barridos cíclicos sucesivos entre 0.0 y +1.7 V. Estas condiciones son las mismas que las utilizadas en el trabajo anterior para la síntesis del polímero sobre el electrodo MWCNTs/GCE, excepto el número de barridos, que es ahora de cinco en lugar de tres. Como puede observarse en la *Figura 24*, cuando la polimerización se lleva a cabo sobre el electrodo GCE, la intensidad de pico de oxidación del NADH aumenta hasta un máximo de cinco ciclos, habiéndose observado en este caso una

mayor estabilidad mecánica de la película polimérica que cuando se electropolimerizó sobre el electrodo modificados con MWCNTs. Finalmente, con el fin de alcanzar una mayor sensibilidad se ha seleccionado un número de ciclos de 5 como óptimo para la preparación del electrodo P3MT/GCE.

A continuación, se depositaron 10 μ L de una suspensión de nanotubos de carbono en Nafion sobre la superficie el electrodo modificado P3MT/GCE. En la *Figura 3* del artículo (pág 389 del mismo) se muestra el efecto que sobre la señal amperométrica del lactato 0.05 mM tiene la cantidad de MWCNTs inmovilizada sobre el electrodo P3MT/GCE. Como puede observarse, la señal aumenta hasta alcanzar un máximo en el intervalo entre 4 y 6 μ g, apreciándose una disminución de la señal para cantidades superiores, lo que probablemente se debe a que una película de nanotubos muy gruesa puede dificultar la comunicación entre la enzima y el electrodo, a la vez que alterar las propiedades del material electródico, en el que ya no se observa el efecto sinérgico debido a la presencia compensada de ambos componentes. Se comprobó, además, que la estabilidad mecánica del biosensor era menor en presencia de una cantidad muy alta de MWCNTs, por lo que finalmente, como compromiso entre una buena sensibilidad y la estabilidad del bioelectrodo, se seleccionaron 4 μ g para estudios posteriores.

Cantidad de enzima

La influencia que tiene la cantidad de enzima inmovilizada sobre la respuesta del biosensor se ha estudiado en el intervalo de 1 a 30 unidades de LDH. Como puede observarse en la *Figura 37*, la corriente en estado estacionario aumenta hasta una carga de 10 unidades, disminuyendo para cantidades superiores, lo que se atribuye al aumento de la resistencia a la transferencia de electrones como consecuencia de una elevada cantidad de biomolécula inmovilizada sobre la superficie del electrodo. Teniendo en cuenta estos resultados, para estudios posteriores se seleccionaron 10 U de LDH.

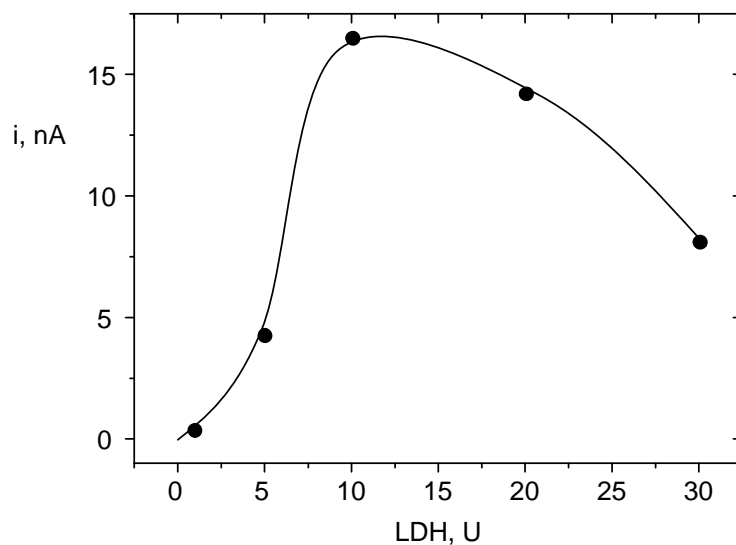


Figura 37. Influencia de la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa sobre la respuesta del biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE; ácido láctico 0.05 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.05M de pH 7.4 conteniendo NAD^+ 5 mM; $E_{ap}=+ 0.4$ V.

Influencia del pH y la naturaleza del medio

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad y la mejor relación señal/ruido, la respuesta amperométrica se ha evaluado empleando diferentes disoluciones reguladoras de trabajo: $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$, Britton-Robinson, ácido bórico/borato, MES y Tris-HCl. En la *Figura 38* se muestran los amperogramas obtenidos para cada uno de los medios ensayados, observándose que la mejor respuesta se obtiene cuando se emplea regulador fosfato. Asimismo, en dicha Figura se muestra el efecto que sobre la señal amperométrica tiene el pH de la disolución de trabajo en el intervalo entre 5.0 y 9.0. Como puede observarse, la corriente en estado estacionario aumenta a medida que lo hace el pH hasta un valor de 8.0, permaneciendo prácticamente constante para valores superiores.

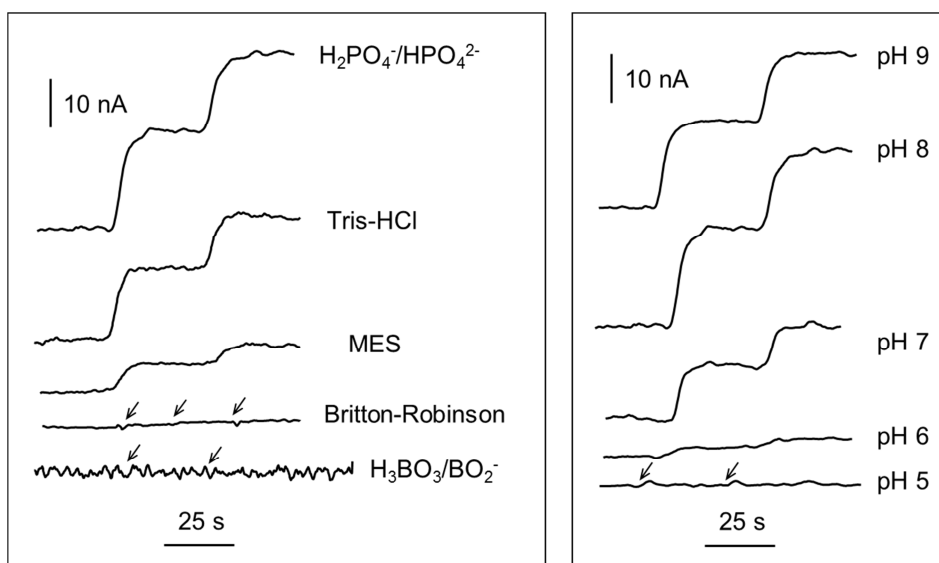


Figura 38. Influencia de la naturaleza del medio y del pH sobre la respuesta del biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE; ácido láctico 0.05 mM; NAD^+ 5 mM; $E_{ap}=+ 0.4$ V.

Concentración de NAD^+

Con el fin de asegurar que la respuesta del biosensor es proporcional a la concentración de analito, es necesario trabajar en presencia de un exceso del cofactor NAD^+ con respecto al sustrato enzimático. Sin embargo, si la concentración de cofactor es muy elevada, es posible que ocurra un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima [Wu, 1996]. En la Figura 4 del artículo (pág 389 del mismo) se muestra la variación de la señal amperométrica para adiciones de ácido láctico 0.05 mM, en función de la concentración de NAD^+ añadido a la disolución. Puede observarse un rápido aumento de la señal hasta que la concentración de cofactor es 10 veces mayor que la de sustrato, seguido de un aumento más lento hasta una concentración 50 veces mayor que el sustrato, donde se alcanza la máxima corriente. Para concentraciones superiores de NAD^+ se observa una ligera disminución de la respuesta, lo que se atribuye al efecto inhibitorio comentado anteriormente. Estos resultados llevaron a seleccionar una concentración de NAD^+ 2.5 mM para estudios posteriores.

Potencial de detección

Con el fin de seleccionar el potencial de detección más adecuado, se evaluó la influencia de esta variable sobre la respuesta amperométrica del biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE. En la *Figura 2* del artículo (pág. 388 del mismo) se muestran como ejemplo los amperogramas obtenidos para adiciones de lactato 0.05 mM en presencia de NAD⁺ 5 mM, aplicando valores de potencial de +0.2, +0.3 y +0.4 V. Como puede apreciarse, la corriente en estado estacionario aumenta a medida que se hace más positivo el potencial aplicado. Así, la respuesta de mayor magnitud es la obtenida a +0.4 V. Sin embargo, también es posible alcanzar una buena señal de corriente aplicando un potencial algo menos positivo, de +0.3 V, lo que permitiría lograr una buena sensibilidad, al tiempo que garantizar la selectividad del método para la determinación de ácido láctico empleando el biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE.

A modo de resumen, en la *Tabla 7* se recogen los resultados óptimos obtenidos para todas las variables implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE.

Tabla 7. Optimización de variables experimentales para la detección de ácido láctico sobre el biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE.

Preparación del biosensor		
Variable	Intervalo	Óptimo
P3MT	-	3MT 0.05M+NaClO ₄ 0.1M 1) 0.0-1.7 V (5 ciclos) 2) 0.7 V, 600 s
Cantidad de MWCNTs	2 – 10 µg	4 µg
Concentración de enzima	1 – 30 U	10 U
Condiciones de detección amperométrica		
Variable	Intervalo	Óptimo
Naturaleza del medio regulador	PBS, Britton-Robinson, borato, MES y Tris-HCl	PBS
pH	5.0 – 9.0	8.0
Concentración de NAD ⁺	0 – 5 mM	2.5 mM
Potencial de detección	+ 0.2 – + 0.4	+ 0.3 V

2.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE LACTATO

Una vez optimizadas las variables experimentales, se eligió un potencial de +0.3 V para obtener el calibrado para lactato que se muestra en la *Figura 39*. El intervalo lineal se extiende entre las concentraciones 1 y 500 μM del analito ($r=0.9993$), con una pendiente de $(6.38 \pm 0.09) \cdot 10^4 \text{ nA M}^{-1}$ y un valor de la ordenada en el origen de $0.26 \pm 0.06 \text{ nA}$. Los límites de detección y de determinación se calcularon con los criterios $3s_b/m$ y $10s_b/m$, respectivamente, donde m es la pendiente del calibrado respectivo, y s_b es la desviación estándar de diez medidas de ácido láctico a la concentración más baja del calibrado (1 μM). Los valores obtenidos fueron 0.56 μM y 1.8 μM , respectivamente.

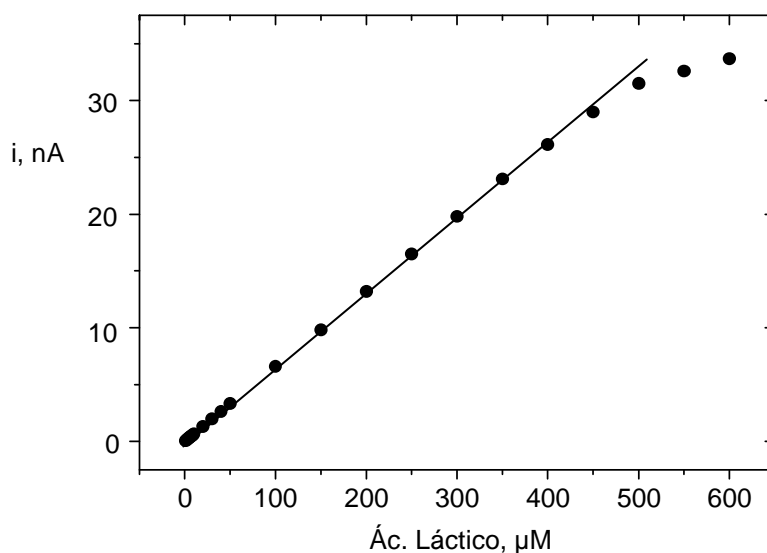


Figura 39. Calibrado para la detección amperométrica de ácido láctico sobre el biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE.

Cuando se comparan estas características con las de otros biosensores de lactato basados en nanotubos de carbono descritos recientemente [*Pereira, 2007; Tsai, 2007; Radoi, 2008*], se observa que el intervalo lineal obtenido es más amplio y que, a pesar de no utilizar mediador redox, el límite de detección alcanzado con la configuración propuesta es aproximadamente un orden de magnitud menor que los obtenidos con

biosensores que emplean mediadores redox como el azul de Meldola [Pereira, 2007] o el azul de variamina [Radoi, 2008] (7.5 y 1 μM , respectivamente). Asimismo, cuando se compara con el biosensor LDH/Chit/MWCNTs/GCE que opera a +0.6 V [Tsai, 2007], el intervalo lineal obtenido con el biosensor desarrollado LDH/MWCNTs/P3MT/GCE es más amplio y el límite de detección similar (0.24 μM), a pesar de ser 300 mv menor el potencial de detección empleado.

Por otro lado, cuando se comparan los resultados obtenidos con los de otros biosensores basados en el empleo de polímeros conductores electrónicos, se observa que el límite de detección alcanzado en este trabajo es muy inferior a los que presentan estas configuraciones, por ejemplo las preparadas con polianilina [Chaubey, 2000] o con polipirrol-poli(vinil) sulfonato [Chaubey, 2001], con límites de detección de 50 y 100 μM , respectivamente.

2.2.1.3. ESTABILIDAD

Para llevar a cabo este estudio, se investigaron diferentes aspectos relacionados con el biosensor desarrollado. En primer lugar se estudió la repetibilidad de las medidas realizadas con un mismo biosensor para ocho disoluciones de ácido láctico 0.05 mM, encontrándose un valor de RSD del 5.7%. Además, se estudió la reproducibilidad de las medidas de cinco disoluciones de ácido láctico 0.05 mM realizadas con cinco biosensores diferentes preparados al mismo tiempo y de la misma manera. En este caso, el valor de RSD fue del 7.4 %. Los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las medidas realizadas con el biosensor, así como la reproducibilidad del proceso de fabricación.

Por otro lado el tiempo de vida del biosensor desarrollado se determinó realizando diariamente tres medidas repetidas de lactato 0.05 mM con un mismo biosensor. En la *Figura 5* del artículo (pág. 390 del mismo) se representó un gráfico de control que muestra los valores medios de estas medidas, así como los límites de control superior e inferior calculados como $\pm 3s$ de los valores obtenidos para el primer día de trabajo (n=3). Entre medidas, el biosensor se almacenaba en disolución reguladora de fosfato de pH 7.0 a 4 °C. Como puede observarse, la respuesta del

biosensor se mantiene dentro de los límites establecidos durante un periodo de tiempo de quince días.

2.2.1.4. INTERFERENCIAS

Empleando las condiciones de detección optimizadas, se estudió el efecto de la presencia de ácidos orgánicos: tartárico, málico, acético, cítrico, úrico y ascórbico, así como el metanol, los cuales pueden estar presentes junto al ácido láctico en muestras reales. En la *Figura 40a* se muestran algunas respuestas amperométricas registradas a +0.3 V para las especies seleccionadas, así como para el ácido láctico, observándose que sólo los ácidos úrico (UA) y ascórbico (AA) exhiben corrientes significativas a los niveles de concentración estudiados.

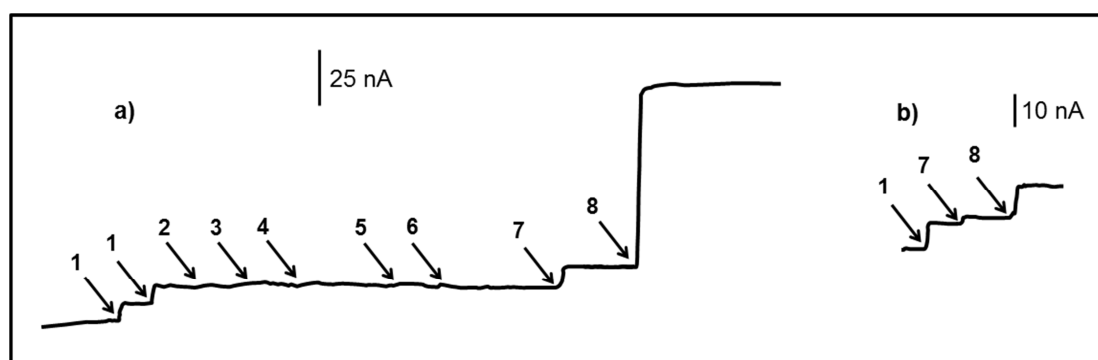


Figura 40. (a) Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE tras la adición de ácido láctico 0.05 mM (1), ácido tartárico 0.01 mM (2), ácido málico 0.01 mM (3), ácido acético 0.01 mM (4), ácido cítrico 0.01 mM (5), metanol 0.01 mM (6), ácido úrico $2 \cdot 10^{-6}$ M (7) y ácido ascórbico 0.01 mM (8). (b) Respuestas obtenidas cuando se deposita una película de Nafión sobre el biosensor. $E_{ap}=+0.3V$.

Con el fin de evitar el posible efecto adverso debido a la presencia de estas especies sobre la respuesta del biosensor, se estudió la posibilidad de depositar una fina película de Nafion sobre la superficie del bioelectrodo. Como se ha señalado, este polímero es capaz de impedir el acceso al electrodo de las especies aniónicas, que es la forma en la que se encuentran los dos ácidos potencialmente interferentes, lo que hace que se reduzca considerablemente su respuesta electroquímica. De este modo, una vez preparado el biosensor, se depositaron 5 μ L de Nafion al 5% en etanol,

observándose que, en estas condiciones (*Figura 40b*), las corrientes en estado estacionario disminuyeron un 92% para el ácido úrico, y un 87% para el ascórbico. Debe destacarse, además, el hecho de que la película de Nafion no afectaba significativamente la señal de ácido láctico, obteniéndose por ejemplo un 89 % de la señal alcanzada en ausencia de Nafion para una concentración de lactato 0.05 mM.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE LACTATO EN MUESTRAS DE VINO

La utilidad del biosensor desarrollado LDH/MWCNTs/P3MT/GCE para la determinación de ácido láctico en muestras reales se demostró analizando distintas muestras de vino tinto.

En esta determinación se aprovechó la ventaja que supone el empleo de esta metodología, llevando a cabo la monitorización del analito directamente en la muestra, a la que no se aplicó tratamiento alguno, exceptuando una dilución 1:1 con disolución reguladora fosfato. Siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 2.1.4.2.*, se adicionó una alícuota de 50 μL de la muestra de vino diluida a la célula de medida, conteniendo 10 mL de PBS de pH 8.0 y NAD^+ 2.5 mM, y se aplicó el método de adiciones estándar por adiciones sucesivas de ácido láctico 0.05 mM.

En primer lugar se evaluó la existencia de efecto matriz comparando la pendiente obtenida realizando un calibrado externo con la pendiente de los calibrados obtenidos mediante adiciones estándar. En la *Tabla 8* se muestran las pendientes obtenidas por el método de adiciones estándar para cada una de las tres muestras analizadas.

Tabla 8. Pendientes de los calibrados de adiciones estándar.

Muestra	Pendiente Adiciones estándar, nA M^{-1}
1 Cabernet Sauvignon	$(6.45 \pm 0.09) \cdot 10^4$
2 Cinsault	$(6.52 \pm 0.08) \cdot 10^4$
3 Carmenere	$(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$

Aplicando el método test de la *t* de Student para un nivel de significación de 0.05 se observó la ausencia de efecto matriz para este tipo de muestras ya que no existían diferencias significativas entre las pendientes obtenidas mediante adiciones estándar y la obtenida realizando un calibrado externo, $(6.38 \pm 0.09) \cdot 10^4 \text{ nA M}^{-1}$.

Con el fin de simplificar el análisis, la determinación de ácido láctico en las distintas muestras de vino se llevó a cabo empleando el método de adiciones estándar. En la *Tabla 9* se recogen los valores de las concentraciones de ácido láctico calculados como la media de tres determinaciones empleando el biosensor desarrollado. Los intervalos de confianza se calcularon para un valor de significación de 0.05, obteniéndose en todos los casos valores de RSD inferiores al 10%. A modo de ejemplo, en la *Figura 6* del artículo (pág. 390 del mismo) se muestran algunas adiciones sucesivas de ácido láctico sobre una de las muestras analizadas (Cabernet Sauvignon), que ponen de manifiesto la ausencia de ruido y la rapidez de respuesta.

Tabla 9. Determinación de ácido láctico en vinos con el biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE.

Muestra	Biosensor LDH/MWCNTs/P3MT/GCE		HPLC
	mM	RSD _{n=3} , %	mM
1 Cabernet Sauvignon	30 ± 4	7.9	28.3 ± 0.1
2 Cinsault	22 ± 2	5.4	20.7 ± 0.1
3 Carmenere	24 ± 2	4.9	22.7 ± 0.1

La validación de los resultados obtenidos para la determinación de ácido láctico en las muestras de vino se ha realizado mediante comparación de los que resultan de aplicar un método cromatográfico de referencia mediante HPLC con detección UV a 210 nm. En la *Tabla 8* se muestran los valores obtenidos con el método de referencia de acuerdo con la metodología descrita en el *Apartado 2.1.4.3*.

La comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos se ha llevado a cabo empleando el ensayo de hipótesis utilizando el método test de la *t* de Student, deduciéndose que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos a un nivel de significación de 0.05. Estos resultados permiten afirmar que no hay errores sistemáticos en el método propuesto y que el biosensor

desarrollado es aplicable a la determinación rápida y fiable de ácido láctico en este tipo de vinos, en un corto tiempo de análisis y a un menor coste económico.

A partir de los resultados obtenidos y descritos en este Capítulo de esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La superficie electródica formada por nanotubos de carbono y el polímero conductor electrónico poli(3-metil tiofeno), y modificada con L-Cisteína, es adecuada para la inmovilización de citocromo c, siendo posible observar la transferencia directa de electrones por parte del citocromo c. El biosensor construido por inmovilización de esta proteína sobre el material citado se comporta adecuadamente para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno de forma sensible y selectiva, y permite la puesta a punto de un método biocatalítico para la determinación de nitrito.
- Los electrodos modificados con dichos materiales también exhiben un intenso efecto electrocatalítico hacia la oxidación de NADH, por lo que son apropiados para la construcción de biosensores basados en enzimas deshidrogenasas. Esta característica se ha aprovechado para poner a punto un biosensor de lactato deshidrogenasa que presenta características analíticas adecuadas para la cuantificación de ácido láctico mediante amperometría en disoluciones agitadas. Las buenas características obtenidas permiten aplicar el biosensor desarrollado al análisis de vinos con un tratamiento de muestra tan sencillo como es una dilución. Los resultados obtenidos empleando el biosensor no

difieren significativamente de los obtenidos con un método cromatográfico de referencia mediante HPLC con detección UV. Además, la metodología que emplea el biosensor presenta ciertas ventajas sobre dicho método de referencia como son su sencillez, cortos tiempos de análisis y bajo coste.

- **[Agüí, 1999]:** Agüí, L.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 145-154.
- **[Agüí, 2007]:** Agüí, L.; Peña-Farfal, C.; Yanez-Sedeño, P.; Pingarron, J. M. *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7946-7952.
- **[Chaubey, 2000]:** Chaubey, A.; Pande, K. K.; Singh, V. S.; Malhotra, B. D. *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 97-103.
- **[Chaubey, 2001]:** Chaubey, A.; Gerard, M.; Singhal, R.; Singh, V. S.; Malhotra, B. D. *Electrochim. Acta* 46 (2001) 723-729.
- **[Chen, 2000]:** Chen, J.; Wollenberger, U.; Lisdat, F.; Ge, B.; Scheller, F.W. *Sens. Actuators B: Chem.* 70 (2000) 115-120.
- **[Chen, 2009]_a:** Chen, Q.; Ai, S.; Zhu, X.; Yin, H.; Ma, Q.; Qiu, Y. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2991-2996.
- **[Cortina-Puig, 2009]:** Cortina-Puig, M.; Muñoz-Berbel, X.; Rouillon, R.; Calas-Blanchard, C.; Marty, J. L. *Bioelectrochem.* 76 (2009) 76-80.
- **[Dai, 2004]:** Dai, Z.; Liu, S.; Ju, H. *Electrochim. Acta* 49 (2004) 2139-2144.
- **[Dickerson, 1971]:** Dickerson, R. E.; Takano, T.; Eisenberg, D.; Kallai, O. B.; Samson, L.; Cooper, A.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1511-1532.
- **[Eddowes, 1997]:** Eddowes, M.J.; Hill, H.A.O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1997) 771-772.

- [Fedurco, 2000]: Fedurco, M. *Coord. Chem. Rev.* 209 (2000) 263-331.
- [Feng, 2005]: Feng, J. J.; Zhao, G.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Anal. Biochem.* 342 (2005) 280-286.
- [Fukushima, 1999]: Fukushima, T.; Adachi, S.; Ichichara, H.; Al-Kindy, S.; Imai, K. *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999) 418-424.
- [Ge, 2002]: Ge, B.; Lisdat, F. *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 53-64.
- [Geng, 2008]: Geng, R.; Zhao, G.; Liu, M.; Li, M. *Biomaterials* 29 (2008) 2794-2801.
- [Girotti, 2000]: Girotti, S.; Muratori, M.; Fini, F.; Ferri, E. N.; Carrea, G.; Koran, M.; Rauch, P. *Eur. Food Res. Technol.* 210 (2000) 216-219.
- [Hasegawa, 2003]: Hasegawa, H.; Fukushima, T.; Lee, J.; Tsukamoto, K.; Moriya, K.; On, Y.; Imai, K. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 886-891
- [Hsu, 2008]: Hsu, C.L.; Chang, K.S.; Kuo, J.C. *Food Control* 19 (2008) 223-230.
- [Jaraba, 1998]: Jaraba, P.; Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3555-3565.
- [Kamin, 1980]: Kamin, R. A.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* 52 (1980), pp. 1198-1205.
- [Konstantinou, 2006]: Konstantinou, I. K.; Hela D. G.; Albanis, T. A. *Environ. Pollut.* 141 (2006) 555-570.
- [Lai, 2008]: Lai, G.S.; Zhang, H.L.; Han, D.Y. *Sens. Actuators B: Chem.* 129 (2008) 497-503.
- [Laviron, 1979]: Laviron, F. *J Electroanal. Chem.* 101 (1979) 19-28.
- [Liu, 2007]_b: Liu, Y-C; Cui, S-Q.; Zhao, J.; Yang, Z-S. *Bioelectrochem.* 70 (2007) 416-420.
- [Luo, 2006]: Luo, X.; Killard, A. J.; Morrin, A.; Smyth M. R. *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 39-44.
- [Monterroso-Marcos, 2003]: Monterroso-Marco, B.; López-Ruiz, B. *Talanta* 61 (2003) 733-741.
- [Nanjo, 2006]: Nanjo, Y.; Yayo, T.; Hayhashi, R.; Yao, T. *Anal Sci.* 22 (2006) 1135-1138.
- [Nikolaus, 2008]: Nikolaus, N.; Strehltz, B. *Microchim. Acta* 160 (2008) 15-55.

- **[Pereira, 2007]:** Pereira, A. C.; Aguiar, M. R.; Kisner, A.; Macedo, D. V.; Kubota, L. T. *Sens. Actuators B: Chem.* 124 (2007) 269-276.
- **[Radoi, 2008]:** Radoi, A.; Compagnone, D.; Valcárcel, M. A.; Placidi, P.; Materazzi, S.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 2161-2169.
- **[Salimi, 2007]:** Salimi, A.; Hallaj, R.; Soltanian, S.; Mamkhezri, H. *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 24-31.
- **[Serra, 1999]:** Serra, B.; Reviejo, A. J.; Parrado, C.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 505-513.
- **[Shie, 2008]:** Shie, J. W.; Yogeswaran, U.; Chen, S. M. *Talanta* 74 (2008) 1659-1669.
- **[Smutok, 2005]:** Smutok, O.; Gayda, G.; Gonchar, M.; Schuhmann, W. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1285-1290.
- **[Song, 2006]:** Song, Y.; Wang, L.; Ren, C.; Zhu, G.; Li, Z. *Sens. Actuators B: Chem.* 114 (2006) 1001-1006.
- **[Tammeveski, 1998]:** Tammeveski, K.; Tenno, T.T.; Mashirin, A.A.; Hillhouse, E.W.; Manning, P.; McNeil, C.J. *Free Radical Biol. Med.* 25 (1998) 973-978.
- **[Tsai, 2007]:** Tsai, Y. C.; Chen, S. Y.; Liaw, H. W. *Sens. Actuators B: Chem.* 125 (2007) 474-481.
- **[Wang, 2003]:** Wang, J.; Musameh, M. *Anal. Chem.* 75 (2003) 2075-2079.
- **[Wang, 2004]_b:** Wang, L.; Wang, E. *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 225-229.
- **[Wu, 1996]:** Wu, Q.; Maskus, M.; Pariente, F.; Tobalina, F. Fernández, V. M.; Lorenzo, E.; Abruña, H. D. *Anal. Chem.* 68 (1996) 3688-3695.
- **[Xiang, 2007]:** Xiang, C.; Zou, Y.; Sun, L.X.; Xu, Fen *Talanta* 74 (2007) 206-211.
- **[Xu, 2003]:** Xu, X.; Tian, B.; Kong, J.; Zhang, S.; Liu, B.; Zhao, D. *Adv. Mater.* 15 (2003) 1932-1936.
- **[Xu, 2007]_b:** Xu, J.M.; Li, W.; Yin, Q.F.; Zhu, Y.L. *Electrochim. Acta* 52 (2007). 3601-3606.
- **[Yang, 2005]_b:** Yang, W.; Bai, Y.; Li, Y.; Sun, C. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 44-50.

- [Yang, 2006]_a: Yang, W.; Li, Y.; Bai, Y.; Sun, C. *Sens. Actuators B: Chem.* 115 (2006) 42-48.
- [Yang, 2006]_b: Yang, M.; Yang, Y.; Qu, F.; Lu, Y.; Shen, G.; Yu, R. *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 211-217.
- [Yang, 2008]_a: Yang, G.; Yuan, R.; Chai, Y.Q. *Colloids Surf. B* 61 (2008) 93-100.
- [Yang, 2008]_b: Yang, M.; Wang, J.; Li, H.; Zheng, J. G.; Wu, N. N. *Nanotechnol.* 19 (2008) 1-6.
- [Zhang, 2007]_b: Zhang, X.; Wang, J.; Wu, W.; Qian, S.; Man, Y. *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2098-2103.
- [Zhao, 2005]: Zhao, G. G.; Yin, Z. Z.; Zhang, L.; Wei, X. W. *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 256-260.
- [Zhao, 2006]: Zhao, G.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Anal. Biochem.* 350 (2006) 145-150.

**III. DESARROLLO DE BIOSENSORES
AMPEROMÉTRICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN
SUERO HUMANO**

El colesterol, cuya estructura se muestra en la *Figura 41*, es un alcohol esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno constituido por cuatro carbociclos condensados que contienen dos grupos metilos en las posiciones C-10 y C-13, una cadena alifática ramificada en la posición C-17 y un grupo hidroxilo en el C-3.

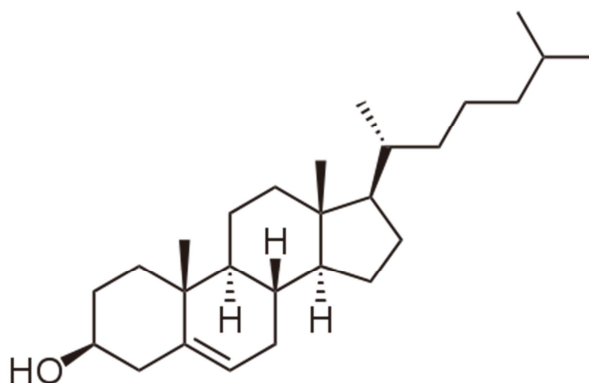


Figura 41. Estructura química del colesterol.

Este lípido se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados e invertebrados, siendo particularmente abundante en el tejido nervioso y en el hígado. Es imprescindible para la vida por su función estructural, confiriendo estabilidad a las membranas celulares, y por ser precursor de muchos otros esteroides existentes en los tejidos animales, como los ácidos biliares, los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, los estrógenos u hormonas sexuales femeninas, las hormonas progesterónicas y las hormonas adrenocorticales.

El colesterol se puede encontrar en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de alta densidad (HDL). Las LDL tienen como finalidad transportar a todas las células el colesterol de origen alimenticio o de síntesis. Estas lipoproteínas se fijan a un receptor específico y liberan en el citoplasma el éster de colesterol que rápidamente es hidrolizado bajo la forma de colesterol libre (1/3 del colesterol total). Sin embargo, es importante que el colesterol LDL se encuentre dentro de los límites normales para evitar que el exceso de colesterol se deposite, por ejemplo, en las paredes de las arterias en forma de ateromas que impiden la buena circulación de la sangre, y por tanto el buen funcionamiento del sistema cardiovascular. En este sentido, el colesterol libre en exceso es esterificado e incorporado en la lipoproteína HDL, siendo

transportado de este modo al hígado donde puede ser catabolizado o eliminado en forma de ácidos biliares.

Por lo comentado anteriormente, la determinación de colesterol en sangre es muy importante con el fin de evitar enfermedades fatales como arteroesclerosis, trombosis cerebral y enfermedades coronarias. El grupo alcohol químicamente reactivo que posee puede ser específicamente oxidado en presencia de la enzima colesterol oxidasa, siendo necesaria una etapa previa de hidrólisis del colesterol esterificado cuando se requiere determinar el contenido total de colesterol en sangre. Esta reacción constituye la base de los ensayos enzimáticos cada vez más utilizados para la determinación de colesterol.

Los biosensores enzimáticos electroquímicos basados en la inmovilización de la enzima colesterol oxidasa en diferentes sustratos electródicos, han demostrado ser una herramienta analítica muy adecuada para la determinación de colesterol [Arya, 2008]. Esta enzima cataliza la oxidación de colesterol por el oxígeno molecular a 4-colesten-3-ona y H_2O_2 (Figura 42). Por tanto, la reacción enzimática puede monitorizarse electroquímicamente, bien por la disminución del contenido de oxígeno en la disolución o bien por la reducción u oxidación amperométrica del peróxido de hidrógeno formado. Un diseño adecuado para aplicar esta última alternativa es el que se basa en la coinmovilización de ChOx y peroxidasa en presencia de un mediador adecuado. Esta configuración permite la utilización de bajos valores de potencial para la detección del peróxido de hidrógeno, minimizando así las interferencias potenciales por parte de sustancias electroactivas presentes normalmente en las muestras que contienen colesterol.

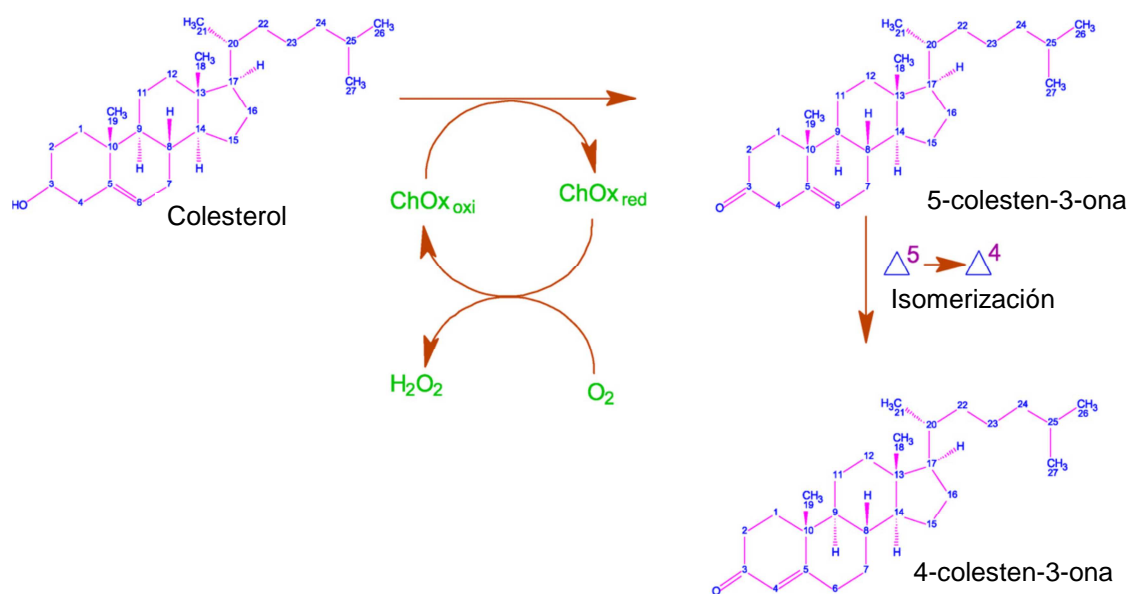


Figura 42. Esquema de la oxidación de colesterol catalizada por la enzima colesterol oxidasa (ChOx).

En este Capítulo se describe la preparación de dos biosensores para la determinación de colesterol empleando distintas configuraciones electrónicas. En primer lugar, se desarrolló una plataforma electroquímica basada en un electrodo de carbono vitrificado modificado con un material híbrido de poli(dialildimetilamonio) (PDDA) y nanotubos de carbono con nanopartículas de oro. En segundo lugar, se ha desarrollado un electrodo basado en un material híbrido de PDDA y nanotubos de carbono con nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído. En ambos casos, las superficies electrónicas se caracterizaron mediante técnicas tanto electroquímicas como no electroquímicas, y se emplearon para la preparación de los biosensores, optimizándose las variables experimentales que afectan a la modificación de la superficie electrónica y a la construcción y funcionamiento de cada sensor. Asimismo, se evaluaron las características analíticas de los métodos desarrollados, así como su selectividad y estabilidad. Finalmente, la utilidad de estos biosensores se demostró mediante la determinación de colesterol libre en muestras de suero humano.

A continuación se describen los aspectos más relevantes de cada uno de estos diseños de biosensores para la determinación de colesterol.

BIOSENSOR DE COLESTEROL BASADO EN UN ELECTRODO HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(DIALILDIMETILAMONIO) CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

1

A lo largo de la Memoria se han considerado las ventajas del empleo de materiales híbridos basados en nanotubos de carbono, nanopartículas y/o polímeros para la preparación de biosensores electroquímicos [Yáñez-Sedeño, 2010]. La fabricación de estos materiales requiere el uso de procedimientos que no alteren las propiedades de ninguno de los componentes de la mezcla, manteniendo al mismo tiempo una buena estabilidad. Como ya se ha señalado en la Introducción, en el caso de los híbridos de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro, una alternativa muy adecuada consiste en utilizar el método de “wrapping” de los nanotubos con polielectrólitos como el PDDA, en el que el polímero interacciona de forma no covalente con la pared de los nanotubos, facilitando la solubilización de estos en disolución acuosa y proporcionando una elevada densidad de sitios iónicos positivos para la posterior adsorción electrostática de las nanopartículas de oro cargadas negativamente [Correa-Duarte, 2006].

En este trabajo se ha seguido la estrategia descrita para la preparación de superficies electródicas de carbono vitrificado modificadas con nanotubos de carbono, PDDA y nanopartículas de oro (AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE). Los electrodos resultantes exhiben una respuesta mejorada hacia la oxidación de H_2O_2 cuando se compara con la de otras configuraciones, siendo por tanto útiles para el diseño de biosensores basados en enzimas oxidasas. Por ello, como aplicación, se construyeron

dos configuraciones para la determinación de colesterol, la primera basada en la enzima colesterol oxidasa y, con el fin de aumentar la selectividad de la detección, un biosensor bienzimático basado en el empleo de peroxidasa y colesterol oxidasa.

A continuación se muestra la publicación resultante de este trabajo para, posteriormente, comentar sus aspectos más relevantes, así como aquellos estudios que no se incluyeron en el artículo.

Gold nanoparticles: Poly(diallyldimethylammonium chloride)–carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: Application to the determination of cholesterol

Marcos Eguílaz, Reynaldo Villalonga, Lourdes Agüí, Paloma Yáñez-Sedeño,
José M. Pingarrón

*Journal of Electroanalytical
Chemistry*



Vol. 661, pp. 171-178, 2011



Gold nanoparticles: Poly(diallyldimethylammonium chloride)–carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: Application to the determination of cholesterol

M. Eguílaz, R. Villalonga, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño*, J.M. Pingarrón

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2011

Received in revised form 21 July 2011

Accepted 25 July 2011

Available online 12 August 2011

Keywords:

Carbon nanotubes

Gold nanoparticles

Poly(diallyldimethylammonium)

Cholesterol oxidase

Cholesterol

Electrochemical biosensor

ABSTRACT

Enzyme biosensors for cholesterol were prepared using a transduction platform constituted of a glassy carbon electrode (GCE) modified with gold nanoparticles (AuNPs)/poly-(diallyldimethyl-ammonium chloride) (PDDA)–multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) nanocomposites. This modified electrode exhibited an improved response to H_2O_2 when compared with other configurations based on CNTs. The incorporation of cholesterol oxidase (ChOx) to this electrode matrix allows the preparation of a biosensor that responded linearly to cholesterol in the 0.02–1.2 mM range with a slope of 2.23 $\mu\text{A}/\text{mM}$ and a limit of detection 4.4 μM . All the variables involved in the preparation and performance of the modified electrode and the enzyme biosensor were optimized. The interferences caused by the presence of ascorbic acid and/or uric acid were minimized by coating the electrode surface with a thin film of Nafion which also enhanced the stability of the biosensor. Moreover, the possibility of preparing bienzyme ChOx–HRP biosensors using the same electrode platform was demonstrated. This allowed a detection potential as low as -50 mV to be applied using hydroquinone as mediator. With this design, the sensitivity was almost one order of magnitude higher than that achieved with the single ChOx biosensor and no interference from ascorbic acid or uric acid was apparent. Both biosensors designs were used for the determination of cholesterol in human serum samples spiked at physiological levels with recoveries ranging between 98.2% and 104%.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of hybrid materials composed of gold nanoparticles (AuNPs) and carbon nanotubes (CNTs) for the preparation of biosensing devices and, in particular electrochemical biosensors, has attracted great attention in the last few years [1 and references therein]. A key reason to explain this growing interest is the claimed synergy between the ability of AuNPs to adsorb biomolecules without losing biological activity with the well known electrocatalytic effect of CNTs towards many electrochemical reactions of biochemical significance. This synergy has demonstrated to allow the achievement of better biocompatibility, stability and sensitivity with biosensors constructed with these hybrid nanocomposites than those attained with biosensing configurations using only AuNPs or CNTs.

On the other hand, PDDA is a water-soluble, quaternary ammonium, cationic polyelectrolyte that usually acts as a positively

charged colloid when it is dissolved in aqueous solutions [2–4]. It has been used as a dispersant of multi-walled CNTs (MWCNTs) since positively charged PDDA can be easily coated on negatively charged surface of the MWCNTs. Moreover, the electrostatic surface interaction with negatively capped AuNPs allows the preparation of composite ensembles suitable for different electroanalytical applications. For instance, the electrochemical behavior of an AuNPs/PDDA–MWCNT multilayer film deposited onto a glassy carbon electrode (GCE) towards O_2 reduction was investigated with a rotating disk electrode (RDE) [5]. Very few antecedents have been found in the literature on the use of this AuNPs/PDDA–MWCNT composite electrode material for the construction of electrochemical enzyme biosensors. An amperometric choline biosensor was reported where AuNPs were attached on thiol-functionalized–MWCNTs and the enzyme choline oxidase was immobilized by adsorption on the AuNPs–MWCNTs matrix. The polymer PDDA was employed to disperse the enzyme immobilized composite as a thin film and it was claimed to play also a role in the adsorption of choline oxidase [6]. Moreover, glucose oxidase showed direct electrochemical transfer at a GCE when it was immobilized with AuNPs/MWCNTs composites with PDDA coatings. The resulting

* Corresponding author.

E-mail address: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

modified electrode was employed for the amperometric determination of glucose [7].

We describe in this work the preparation and analytical performance of novel cholesterol biosensor designs using a GCE modified with the AuNPs/PDDA/MWCNTs composite as electrode substrate. The modified electrode exhibited an improved response to H_2O_2 when compared with other configurations based on CNTs. A first biosensor design involved the immobilization of the enzyme cholesterol oxidase (ChOx). The incorporation of the enzyme allowed the preparation of a biosensor for cholesterol that combined the advantageous properties of AuNPs and CNTs, thus providing enhanced electroanalytical performance. The developed biosensor was applied to the analysis of spiked human serum. Moreover, a second bi-enzyme design making use of both ChOx and horseradish peroxidase (HRP) was implemented on the composite nanostructured electrode in order to decrease the detection potential for cholesterol thus enhancing the selectivity of the developed methodology.

It is well known that the determination of cholesterol levels in human blood is important for prevention of cerebral thrombosis, heart disease or arteriosclerosis. Enzyme biosensors have played an important role in this field because they allow the rapid and accurate determination of cholesterol to be performed with a minimum sample treatment. ChOx immobilized on different substrates has been used for the preparation of various bioelectrochemical devices [8]. Conducting polymers such as poly(pyrrole) [9–11] or polyaniline [12,13] were employed for this purpose due to the enzyme entrapment in the polymer matrix provides a relatively high stability and prevents fouling of the electrode surface. Self assembled monolayers of thiols [14,15] and sol-gel and hydrogel materials [16,17] have demonstrated to be also suitable matrices for ChOx immobilization. Regarding nanomaterials, CNTs and composites of CNTs with nanoparticles and other materials have been reported recently as electrode substrates for the preparation of ChOx biosensors. Dhand et al. prepared nanocomposite films of polyaniline (PANI) and multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) onto indium tin oxide (ITO)-coated glass plates. Further covalent immobilization of ChOx via *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) chemistry allowed the preparation of a cholesterol biosensor that used linear sweep voltammetry for the reaction monitoring [18]. Metal nanoparticles–MWCNTs composites were also employed. For example, AuNPs electrodeposited onto thiol-functionalized MWCNTs were used to prepare an amperometric biosensor where ChOx was immobilized on a cross-linked matrix of chitosan and the room-temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [19]. MWCNTs dispersed in a platinum nanoparticle-doped chitosan solution together with poly(sodium-*p*-styrenesulfonate) salt were used to prepare multilayer films on gold electrodes and quartz glass slides with a layer-by-layer (LBL) methodology. ChOx was subsequently immobilized on the electrode surface using glutaric dialdehyde [20]. Nickel hexacyanoferrate nanoparticles attached to MWCNTs through histidine tags were also used to immobilize ChOx showing a good stability [21]. Furthermore, direct electrochemistry of ChOx was achieved at a multilayer ChOx/MWCNTs prepared by the LBL technique onto a PDDA-modified graphite electrode [22].

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs, 30 ± 15 nm \varnothing , 95% purity) were supplied by NanoLab, Brighton, MA. Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) (20%, w/w in water) was from Sigma–Aldrich. Enzymes used were cholesterol oxidase (ChOx)

from *Brevibacterium* sp. (Sigma, 34 U/mg solid) and horseradish peroxidase (HRP) Type II (Sigma, 188 U/mg solid). The lyophilized ChOx powder (500 units) was dissolved in 1.0 mL 0.1 M PBS of pH 7.4 and, from this, aliquots were prepared and frozen at -50 °C until use. HRP solutions containing 1880 U/mL were also prepared in 0.1 M PBS of pH 7.4. Stock 0.02 M cholesterol (Sigma, 99%) solutions of cholesterol were prepared by dissolving 0.0386 g by gentle stirring in 0.2 mL aqueous Triton X-100 (Merck) at 60 °C and dilution with 0.1 M phosphate buffer solution of pH 8.0 up to a 5.0 mL volume. More diluted cholesterol solutions were prepared with 0.1 M phosphate buffer solution of pH 8.0 containing 1% Triton X-100 (PBS). PBS was also used as supporting electrolyte. 100 mM hydrogen peroxide (Scharlau, 35%) solutions were prepared by dilution of 9 μL in 1 mL 0.1 M PBS. Moreover, 100 mM hydroquinone (HQ) (Sigma) solutions were prepared daily in 0.1 M PBS pH 7.5. Aqueous 1% $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma >49% as gold) and 1% sodium citrate (Panreac, 98%) solutions were used to prepare gold colloids by adding 2.5 mL of sodium citrate solution to 100 mL of a boiling aqueous solution containing 1 mL 1% (w/w) HAuCl_4 . Preparations were stored in dark glass bottles at 4 °C for further use. Nafion (Aldrich, 5% wt.) was also used. Diluted solutions of Nafion were prepared in pure ethanol. Ascorbic acid (Fluka, 99.5%), uric acid (Sigma, 99%), glucose (Panreac, >99%) and lactic acid (lithium salt, Sigma, 97%) were also employed for the interferences study. All chemicals were of analytical-reagent grade and the water used was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, NA, USA). The analyzed samples were lyophilized human serum (Sigma) spiked with cholesterol.

2.2. Apparatus and electrodes

Amperometric and voltammetric measurements were carried out with a BAS 100 B potentiostat (West Lafayette, IN, USA) provided with a BAS C2 EF-1080 cell stand and controlled by BAS 100W 2.0 electrochemical analysis software. A three electrodes (BAS VC-2 5-mL) glass electrochemical cell was used. The electrochemical biosensor was constructed from a Metrohm 6.084.010 glassy carbon electrode (3 mm \varnothing) and it was used as working electrode. The reference electrode was an Ag/AgCl/KCl 3 M BAS MF 2063 and a BAS MW 1032 Pt wire was used as the auxiliary electrode. Electrochemical impedance measurements were performed using a μ -Autolab Type III with FRA2 software (Ecochemie).

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of PDDA/MWCNTs

MWCNTs were chemically shortened and carboxylated by treatment under ultrasonic stirring with a 3:1 mixture of sulfuric and nitric acids for 5 h. The resulting product was centrifuged at 14,000 rpm and washed repeatedly with distilled water up to pH 7. Once dried, functionalization with PDDA was performed by dispersion of 10 mg carboxylated MWCNTs in 20 mL of a 0.25% PDDA aqueous solution containing 0.5 M NaCl and sonication for 30 min [23]. The resulting dispersion was centrifuged at 14,000 rpm and washed three times with water. Finally, 4 mg of dry PDDA/MWCNTs were dispersed in 5 mL of water and the resulting solution was sonicated for 5 min before use.

2.3.2. Preparation of AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

Firstly, the GCE surface was polished with 0.3 μm alumina slurries, rinsed thoroughly with de-ionized water, sonicated for 30 s in water and 30 s in acetone, and dried in air. PDDA/MWCNTs/GCE was prepared by casting 10 μL of the above mentioned PDDA/MWCNTs dispersion onto the GCE surface and dried under IR radiation. Further, 10 μL of the prepared colloidal gold were

dropped onto the modified electrode surface and let stand for 30 min at 4 °C.

2.3.3. Preparation of ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE and HRP–ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensors

Immobilization of ChOx was carried out by dropping a 5- μ L aliquot of a 200 U/mL ChOx solution in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.4 onto the modified electrode surface, and letting the solvent to be evaporated. Then, 5 μ L of 0.5% Nafion were dropped and the bio-electrode was let to evaporate at room temperature. Similarly, the bienzyme electrode was prepared by dropping a 5- μ L aliquot of a 940 U/mL HRP and 200 U/mL ChOx solution in the same buffer.

2.3.4. Determination of cholesterol in spiked human serum

The solid serum was reconstituted in 1 mL cholesterol solution (2.0, 5.0 or 7.0 mM) by mixing up to the total dissolution. Serum was directly analyzed by dilution of 100- μ L aliquots up to 5.0 mL with 0.1 M PBS of pH 8.0. The ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE or HRP–ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor was immersed into the stirred solution, which contained 0.5 mM hydroquinone when the bienzyme electrode was used, and the steady-state current was measured at a constant potential of +0.6 V vs. Ag/AgCl, in the case of the ChOx biosensor, or –0.05 V for the bienzyme electrode. The standard additions method, involving the addition of 0.1 mM cholesterol stock solution aliquots, was used to quantify the cholesterol contents.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and characterization of the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

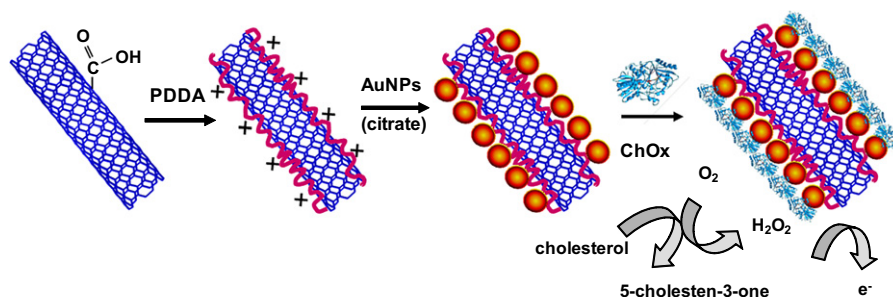
Scheme 1 displays the different steps involved in the construction of the modified electrode. Firstly, MWCNTs were carboxylated by treatment with a 3:1 sulfuric acid:nitric acid mixture. The FT-IR spectrum of the resulting product (not shown) showed a peak at 1725 cm^{-1} which is attributed to $\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations, thus demonstrating the efficiency of the carboxylation protocol. Then, negatively charged carboxylated MWCNTs were coated with positively charged PDDA by electrostatic interaction [23]. As described in the Section 2, the GCE was then modified by casting with an appropriate aliquot of the PDDA/MWCNTs dispersion. Finally, composite nanoensembles were prepared on the electrode surface by electrostatic interaction with negatively capped AuNPs.

All the variables involved in the preparation of the electrode were optimized using H_2O_2 as the target compound. Firstly, the influence of the PDDA/MWCNTs loading deposited on the GCE on the amperometric response for 0.1 mM H_2O_2 measured at +600 mV was checked (Fig. 1a). As it can be observed, the steady-state current increased sharply with increasing the amount

of PDDA/MWCNTs up to 4 μg and then it levelled off. In order to achieve a complete electrode surface modification, a PDDA-coated MWCNTs loading of 8 μg was selected for further work. As it is described in Section 2.3.2, AuNPs were then added to the PDDA/MWCNTs/GCE and incubated at 4 °C. The loading of deposited AuNPs was shown to be dependent on the incubation time as demonstrated by the cyclic voltammograms recorded in 0.1 M H_2SO_4 with AuNPs/PDDA/MWCNTs/GC electrodes prepared upon deposition of gold nanoparticles and allowing incubation to proceed onto the electrode surface for different times (Fig. 2). The characteristic anodic and cathodic peaks, corresponding to the gold oxidation and the reduction of gold oxides, demonstrated the presence of AuNPs onto the electrode surface. Furthermore, both the anodic and cathodic peak current increased with the time of incubation suggesting a higher gold loading. The scanning electron micrographs obtained for AuNPs/PDDA/MWCNTs/GC electrodes prepared with 30 and 60 min of incubation are displayed in Fig. 3. As it can be seen, an incubation time of 60 min gave rise to a huge accumulation of AuNPs onto the electrode surface and carbon nanotubes practically disappeared. In order to optimize the AuNPs loading, the amperometric signal for 0.1 mM H_2O_2 was measured with the modified electrodes prepared with different times of incubation (Fig. 1b). The current exhibited a rapid increase with time up to 40 min and then decreased for longer incubation periods. These results clearly evidenced an improvement in the electron transfer kinetics as a consequence of the presence of AuNPs. The current decrease observed in the presence of an excess of AuNPs can be attributed to an increase in the resistance and double layer capacitance under a high AuNPs loading on the modified electrode. As a compromise between sensitivity and the shorter incubation time, 30 min were selected for further work. The influence of pH on the amperometric response for H_2O_2 was also tested over the 6.5–9.0 range. The steady-state current measured at the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE increased sharply with pH up to pH 8.0 and levelled off for higher values (Fig. 1c). In order to get the highest sensitivity, pH 8.0 was selected for further work.

The modified electrode was voltammetrically characterized by using 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in 5 mM KCl as redox probe. The anodic peak current measured by cyclic voltammetry varied linearly with the square root of the potential scan rate over the 10–150 mV/s range indicating a diffusion controlled electrochemical process (results not shown). From the i_p vs. $v^{1/2}$ plot, the electrochemical surface of the modified electrode was calculated from the Randles–Sevcik equation $i_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2}$ with $D = 7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [24]. The obtained value was 0.232 cm^2 .

The effect of the potential value applied to the bare GCE, the PDDA/MWCNTs/GCE and the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE on the steady-state current measured for a 0.1 mM H_2O_2 was compared. Fig. 4 shows that, as expected, no current was observed in the overall potential range at the bare GCE. However, significant anodic currents were recorded at the modified electrodes for potential



Scheme 1. Schematic display of the steps involved in the preparation of the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor. Similar steps were involved for the HRP–ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor.

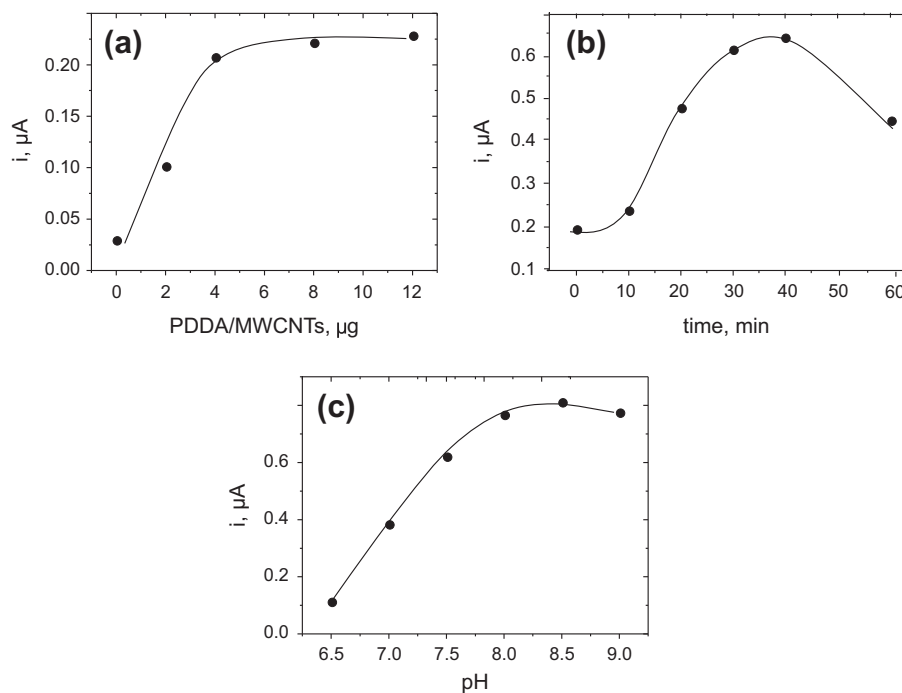


Fig. 1. Effect of: the loading of PDDA/MWCNTs on the GCE (a), the incubation time of AuNPs deposited on the PDDA/MWCNTs/GCE (b), and pH value (c) on the amperometric response measured for 0.1 mM H_2O_2 at an applied potential of +600 mV.

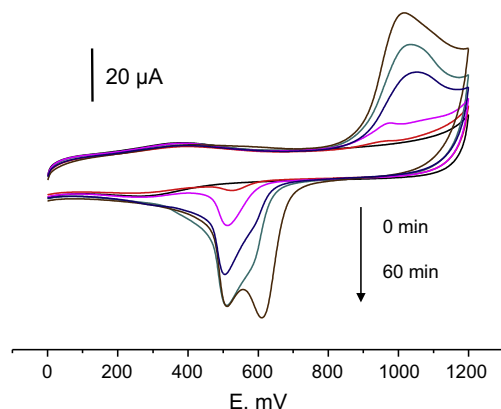


Fig. 2. Cyclic voltammograms recorded with AuNPs/PDDA/MWCNTs/GC electrodes prepared upon addition of colloidal gold onto PDDA/MWCNTs/GCE and allowing incubation on the electrode surface to proceed for 0; 10; 20; 30; 40 and 60 min. 0.1 M H_2SO_4 ; $\nu = 50$ mV/s.

values more positive than +0.4 V which revealed the electrocatalytic effect of MWCNTs towards the oxidation of H_2O_2 . Furthermore, the incorporation of AuNPs to the PDDA/MWCNT/GCE electrode produced a remarkable enhancement of the oxidation current suggesting a synergic effect of both nanomaterials in the improved kinetics for the H_2O_2 oxidation process as well as an enhanced active surface area. In order to reach the best sensitivity, a potential value of +0.6 V was selected for further work.

3.2. Analytical characteristics for the determination of H_2O_2 at the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

Under the above mentioned conditions, and accordingly to the results shown in Fig. 4, important differences in sensitivity are evidenced in the amperometric calibration plots constructed with PDDA/MWCNTs/GCE and AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. The slope

values over the 0.2–1.0 mM H_2O_2 concentration range, were 2.22 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for PDDA/MWCNTs/GCE and 7.27 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Moreover, this latter slope value was higher than those reported in the literature for other CNTs-modified electrodes such as, for example, a gold nanoelectrode ensembles (AuNEEs)/MWNTs/chitosan/GCE, with $m = 2.35$ $\mu\text{A}/\text{mM}$ [25], a MWCNTs/AgNPs/AuE, with $m = 1.42$ $\mu\text{A}/\text{mM}$ [26], or a AuNPs/MWCNTs/Teflon composite with $m = 4.3$ $\mu\text{A}/\text{mM}$ [27]. Another relevant characteristic of AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE response towards the H_2O_2 electrooxidation is the rapidity. So the time elapsed between the cholesterol addition and the current recorded at 95% of the steady-state current was approximately 4 s.

3.3. Preparation of the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor

As it shown in Scheme 1, the enzyme ChOx was immobilized on the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE by taking advantage on the well known adsorption ability of surface-confined AuNPs towards biomolecules without altering their biological activity [28].

The enzyme loading on the electrode surface was firstly optimized. The steady-state current for 0.1 mM cholesterol solutions was measured at +0.6 V with different biosensors prepared with ChOx ranging between 0.25 and 2.5 units. The obtained results (not shown) showed that the current increased up to 1 unit of ChOx and then exhibited an almost constant value for higher loadings. The Nyquist plot recorded by electrochemical impedance spectroscopy at the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE in a 0.1 M KCl solution containing 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, exhibited a linear plot as expected due to the high conductivity of the electrode surface. However, a typical impedance semicircle with a charge transfer resistance of 43 Ω was obtained in the case of the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, thus confirming the successful immobilization of ChOx on the electrode surface.

In order to minimize the negative effect of the relatively high detection potential value used in this biosensor design on the selectivity, we investigated the effect of the incorporation of a thin Nafion film on the biosensor surface. It is well known that this

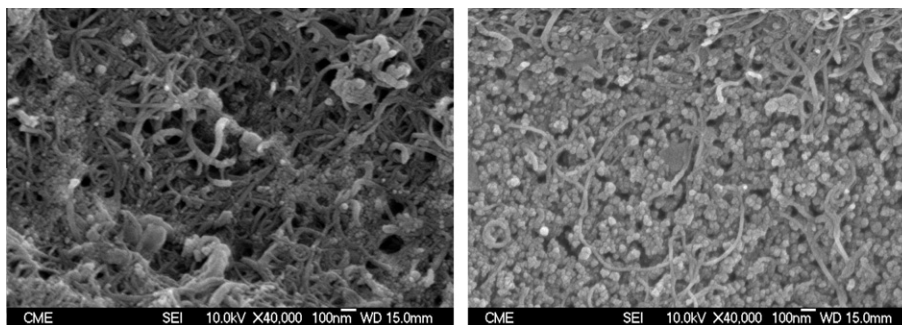


Fig. 3. Scanning electron micrographs of AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCEs prepared with different incubation times of AuNPs deposited onto PDDA/MWCNTs/GCE: 30 min (left) and 60 min (right).

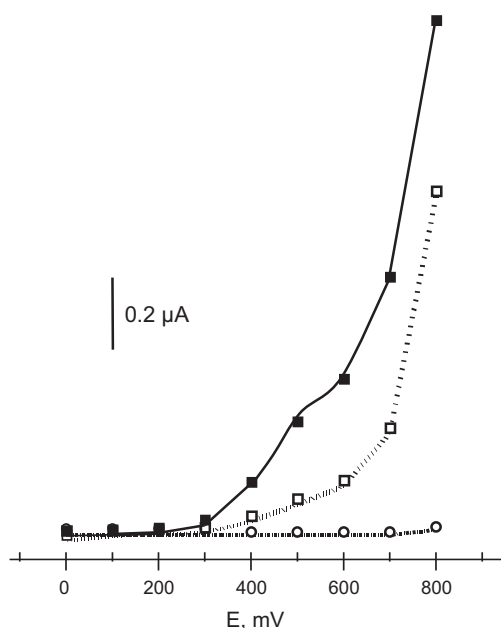


Fig. 4. Steady-state current vs. potential plots for 0.1 mM H₂O₂ measured at a GCE (○), a PDDA/MWCNTs/GCE (□) and a AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (■).

perfluorinated polymer minimizes potential interferences from negatively charged compounds at the pH of detection. A Nafion loading of 5 μL of a 0.5% wt. Nafion solution onto the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE demonstrated to be useful for such purpose without affecting dramatically the sensitivity of the biosensor.

It is interesting to note that the incubation time of AuNPs deposited onto the modified electrode surface exhibited a similar effect on the amperometric response for 0.1 mM ChOx at the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor than that mentioned above for the detection of H₂O₂ at the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Finally, the influence of pH was also evaluated in the 6.5–9.0 pH range. The current for cholesterol increased notably from pH 6.5 to pH 8.0 showing a sharp decrease for higher pH values as a consequence to the lower activity of the enzyme in more alkaline media [29]. Accordingly, pH 8.0 was selected to evaluate the analytical characteristics of the developed biosensor.

3.4. Calibration graph and analytical characteristics

Under the optimized conditions described above, a calibration plot for cholesterol exhibiting a linear range ($r = 0.996$) in the

0.02–1.2 mM concentration range was constructed with the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor. The analytical characteristics of the method for the determination of cholesterol are summarized in Table 1, in which those reported in the literature for other ChOx biosensors involving also carbon nanotubes are presented [17–22,30,31]. The detection limit (LOD) was calculated according to the $3s_b/m$ criterion, where m is the slope of the linear portion in the calibration graph, and s_b was estimated as the standard deviation ($n = 10$) of the amperometric signals measured for different cholesterol solutions at the lowest concentration level of the calibration graph. As it can be seen in Table 1, the slope was among the higher values achieved and the limit of detection was comparable with the best ones reported with other designs despite different criteria were used to calculate LODs.

The enzyme reaction at the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, as it was demonstrated by calculating the “ x ” parameter from the corresponding Hill’s plot ($[\log(i_{\text{max}}/i) - 1]$) vs. the log of cholesterol concentration), which was practically equal to the unity. Therefore, the maximum rate of reaction (V_m) and the apparent Michaelis–Menten constant K_M^{app} were calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plot. The values obtained were 3.0 μA and 0.89 mM, respectively. This K_M^{app} value is lower than that reported for the enzyme immobilized in polypyrrole (9.8 mM) [11] or polyaniline (6 mM) [32] and similar to that calculated by immobilization on a MWCNTs/SiO₂/CS/PB/GCE at (0.24) [17]. The low K_M^{app} value reflects the high affinity of the enzyme for the substrate when it is immobilized in the AuNPs/PDDA/MWCNTs nanoenvironment.

Successive amperometric measurements for five different 0.1 mM cholesterol solutions with the same biosensor provided a relative standard deviation (RSD) value of 2.8%. Furthermore, the reproducibility of the responses obtained with five different ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNT/GCE biosensors was also evaluated. In this case, the RSD value was 4.8%. These results show fairly well the good repeatability and reproducibility achieved with this kind of biosensors. Moreover, the lifetime of a single ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNT/GCE biosensor was checked by performing daily three measurements for 0.1 mM cholesterol. The biosensor was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ in the buffer solution of pH 7.4 after its use. The amperometric response did not show significant differences (within $\pm 3 \times$ standard deviation of the mean value measured the first day) for 5 days without applying any regeneration procedure to the bioelectrode surface. The biosensor exhibited 88% of the initial response on the 7th day of use. This lifetime is acceptable although the value is hard to be compared with the results provided in the literature where most of the papers report only an storage ability without measuring in between.

Table 1
Analytical characteristics of cholesterol oxidase-CNTs-based electrodes for cholesterol determination.

Electrode	Detection potential (V)	Linear range (mM)	Slope ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	LOD (μM)	RSD ^a (%)	K_M^{app} (mM)	Storage ¹ or operational ² stability ^b	Resp. time (s)	Sample	Refs.
ChOx/MWCNTs/SiO ₂ /Chit/PB/GCE	-0.05 vs. Ag/AgCl	0.004–0.7	1.55	1.0 (S/N = 3)	4.2 (n = 8)	0.24	50 days ² (89%)	13	Serum	[17]
ChOx/PANI/-CNTs/ITO	0.28 vs. Ag/AgCl	1.29–12.93	6.8	–	–	–	12 weeks ¹ (95%)	10	–	[18]
ChOx/Chit-IL/AuNPs/(SH)-MWCNT/ITO	-0.05 vs. Ag/AgCl	0.5–5	0.2	–	1.9 (n = 12)	–	20 days ¹ (95%)	7	Serum	[19]
ChOx/(PtNPs/CNTs/Chit/PSS) ₇ MPA/AuE	0.4 vs. SCE	0.005–5	–	3 (S/N = 3)	–	–	1 week ¹ (90%)	<20	Serum	[20]
ChOx/Chit/NiNP/MWCNT/GCE	-0.2 vs. SCE	0.005–3	–	1 (S/N = 3)	5.8 (n = 10)	–	1 month ¹ (85%)	<15	Serum	[21]
PDDA(MWCNTs/ChOx) ₅ /graphite	-0.4 vs. SCE	0.2–1	136.5	30	4.2 (n = 10)	–	1 week ¹ (92%)	–	–	[22]
ChOx/PtNPs/Chit/MWCNTs/GCE	0.4 vs. Ag/AgCl	–	3.1	4.79	–	–	7 days ² (60%)	–	–	[30]
PPD(PDDA/ChOx) _n /MWCNTs/AuE	0.7 vs. Ag/AgCl	1–6	0.175	0.2	–	7.17	–	30	–	[31]
ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	0.6 vs. Ag/AgCl	0.02–1.2	2.23	4.4 (3s _b /m)	2.8 (n = 5)	0.89	7 days ² (88%)	30–35	Serum	This work
ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	-0.05 vs. Ag/AgCl	0.01–1.05	18.6	2.2 (3s _b /m)	5.1 (n = 5)	2.18	8 days ² (78%)	15–20	Serum	This work

ChOx, cholesterol oxidase; PANI, poly(aniline); MWCNTs, multiwalled carbon nanotubes; ITO, indium tin oxide; Chit, chitosan; IL, ionic liquid; AuNPs, gold nanoparticles; (SH)-MWCNTs, thiol-modified multiwalled carbon nanotubes; PB, prussian blue; GCE, glassy carbon electrode; PtNPs, platinum nanoparticles; PSS, poly(sulfone) salt; MPA, mercapto propionic acid; AuE, gold electrode; NiNP, nickel hexacyanoferrate nanoparticles; PDDA, poly(diallyl-dimethylammonium chloride).

^a Repeatability with one biosensor.

^b Percentage of original current.

3.5. Interferences

The effect of the presence of ascorbic acid, uric acid, glucose and lactic acid, which can interfere in the determination of cholesterol in real samples, was checked using the ChOx/AuNPs/PDDA/

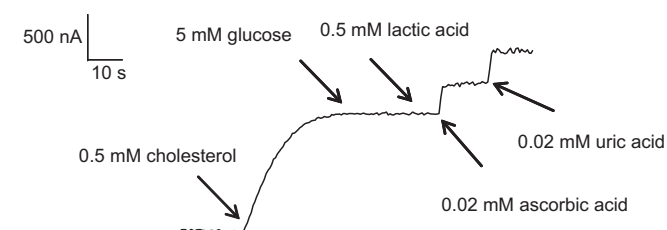


Fig. 5. Amperometric signals for 0.5 mM cholesterol, 5 mM glucose, 0.5 mM lactic acid, 0.02 mM ascorbic acid and 0.02 mM uric acid measured at +600 mV with the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor.

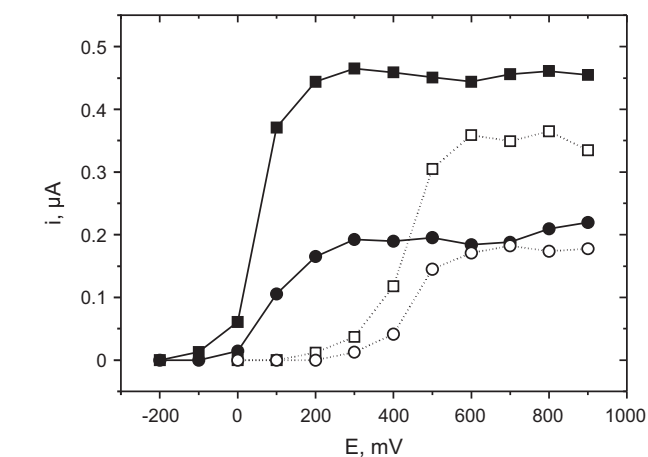


Fig. 6. Amperometric responses recorded at the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor for 10^{-5} M ascorbic acid (—) and uric acid (⋯) in the absence (■) and in the presence (□) of 5 μL 0.5% Nafion solution coating the electrode surface.

MWCNT/GCE biosensor. Fig. 5 shows the amperometric responses measured for these compounds at the concentration levels that are usual in human sera. However, the concentration of cholesterol measured in Fig. 5 is approximately ten times lower than the normal level in serum. As it can be seen, glucose and lactic acid did not give response under the employed conditions despite the high interferent-to-cholesterol concentration ratio. However, ascorbic acid and uric acid produced relatively significant amperometric signals in spite of the presence of Nafion onto the electrode surface. In order to visualize the effect of the Nafion coating, the amperometric responses measured for ascorbic acid and for uric acid with the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor with and without such coating are displayed in Fig. 6. As commented above, although a significant decrease of the measured current was observed in the presence of Nafion, a noticeable response for both acids is still evident. Nevertheless, as it will be shown below, the determination of cholesterol in human sera with the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNT/GCE biosensor implies a sample dilution and therefore, at the usual

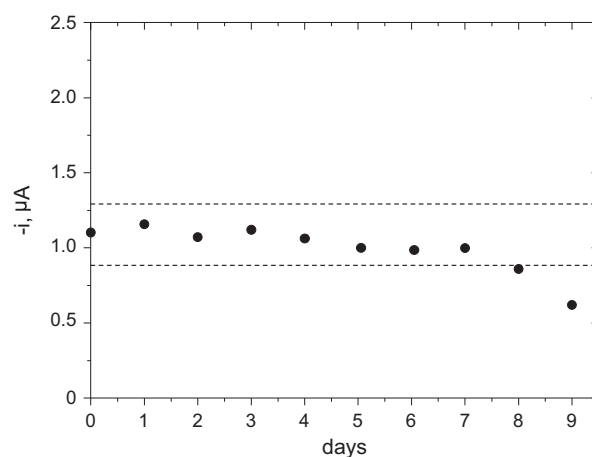


Fig. 7. Control chart constructed for a ChOx-HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE biosensor for the measurement of 0.05 mM cholesterol. The limits of control were set at $\pm 3 \times$ standard deviation of the mean value ($n = 3$) measured the first day.

Table 2
Determination of cholesterol in spiked serum.

Sample	ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE					ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE				
	Cholesterol found (mM)	Average (mM)	RSD (%)	Cholesterol added (mM)	Rec. (%)	Cholesterol found (mM)	Average (mM)	RSD (%)	Cholesterol added (mM)	Rec. (%)
1	2.04; 1.91; 1.96; 1.93; 2.02	1.97	2.9	2.0	98.5	2.13; 2.25; 1.98; 2.06; 2.19	2.12	5.0	2.0	104
2	4.92; 5.06; 5.06; 4.93; 5.12	5.02	1.8	5.0	100	5.07; 4.81; 4.79; 5.13; 4.75	4.91	3.6	5.0	98.2
3	7.19; 7.15; 7.22; 6.94; 7.17	7.14	1.6	7.0	102	7.42; 7.19; 7.51; 6.94; 7.37	7.29	3.1	7.0	104

concentration ratios in sera, the interference from both acids resulted to be negligible.

3.6. ChOx/HRP bienzyme biosensor

With the aim of evaluating the possibility of preparing bienzyme electrodes using the approach developed in this work with the AuNPs/PDDA/MWCNTs/GC electrode platform and also to try to improve the analytical performance of the cholesterol biosensor, we constructed a bienzyme ChOx/HRP biosensor following a similar methodology with that described for the single ChOx bioelectrode (Section 2.3.3). A useful approach to increase the sensitivity and the selectivity of cholesterol biosensors is to immobilize ChOx with HRP. Using an appropriate mediator, this design allows low potential values to be employed for the amperometric detection of hydrogen peroxide thus minimizing potential interferences from electroactive substances present in real samples [33]. Preliminary experiments as well as literature antecedents on HRP bienzyme biosensors led us to use a detection potential of -50 mV and 0.5 mM hydroquinone as redox mediator to monitor the enzyme reaction and check the biosensor behavior. Under these conditions, the HRP loading on the modified electrode surface was optimized keeping constant 1 U ChOx in the enzymes mixture. A maximum current response for 0.2 mM cholesterol was observed when using 4.7 U HRP and, therefore, this enzyme loading was selected for further work.

The analytical characteristics of the bienzyme biosensor are summarized in Table 1. As it can be seen, the range of linearity ($r = 0.997$) is very similar to that obtained with the single ChOx biosensor, but the sensitivity, expressed as the slope of the linear calibration graph, is almost one order of magnitude higher and the detection limit is just the half. The repeatability of the measurements and the reproducibility between bioelectrodes provide slightly higher RSD values than for the single ChOx biosensor. Regarding lifetime, a similar set of experiments to that described in Section 3.3 provided the results shown in Fig. 7, where it can be observed the amperometric responses remained within the control limits for 7–8 days without any treatment of the biosensing surface. The biosensor exhibited 58% of the initial response on the 9th day of use.

Finally, the same potential interferences checked in Section 3.4 were also evaluated with the bienzyme electrode. As expected, in this case no significant interference was observed from both ascorbic acid and uric acid since at the applied potential their oxidation currents were approximately three orders of magnitude lower than that measured for cholesterol.

3.7. Determination of cholesterol in spiked human serum

The usefulness of the enzyme biosensor designs developed in this work for the analysis of real samples was tested by analyzing a human serum spiked with cholesterol at three different concentration levels, 2.0 , 5.0 and 7.0 mM. As indicated in Section 2.3.4, a 100 - μ L aliquot of reconstituted serum was diluted with 0.1 M PBS solution up to a 5.0 mL volume, and the determination of

cholesterol was accomplished by applying the standard additions method which involved additions of 0.1 mM cholesterol from the stock solution. The results obtained with both the single ChOx and the bienzyme ChOx/HRP biosensors are summarized in Table 2. As it can be seen, mean recoveries ranged between 98.5% and 102% with relative standard deviations of 2.9%, 1.8% and 1.6% for the ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNT/GCE, while the corresponding recoveries were between 98.2% and 104%, with relative standard deviations of 5.0%, 3.6% and 3.1% in the case of the bienzyme biosensor. The obtained results demonstrated the usefulness of the developed biosensors for the rapid analysis of free cholesterol in serum samples. The recoveries achieved showed also that no significant interference was apparent from other compounds present in the human serum samples, thus confirming the validity of the methodological approach.

4. Conclusions

The suitability of electrode platforms formed with AuNPs, PDDA and MWCNTs nanocomposites for the construction of both single and bienzyme electrochemical biosensors has been demonstrated taking the determination of cholesterol as analytical target. This kind of platforms offers the possibility of extremely simple enzymes immobilization protocols to be used with no need to involve covalent bonds, without affecting significantly the performance of the resulting biosensors. Moreover, the use of established strategies to minimize the effect of potential interferences in real samples is feasible. The results obtained in the analysis of human sera spiked with cholesterol at physiological levels visualize fairly well the usefulness of the biosensor designs developed in this work.

Acknowledgements

R. Villalonga acknowledge to Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01, CTQ2009-12650, CTQ2009-09351) and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642, Programme AVANSENS is gratefully acknowledged.

References

- [1] P. Yáñez-Sedeño, J. Riu, J.M. Pingarrón, X. Rius, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 939–953.
- [2] X.-Q. Ran, R. Yuan, Y.-Q. Chai, C.-L. Hong, X.-Q. Qian, *Colloids Surf., B* 79 (2010) 421–426.
- [3] Y.L. Zhou, Y.Z. Li, *Colloids Surf., A* 233 (2004) 129–135.
- [4] N. Li, H.W. Zhao, R. Yuan, K.F. Peng, Y.Q. Chai, *Electrochim. Acta* 54 (2008) 235–241.
- [5] N. Alexeyeva, K. Tammeveski, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 140–146.
- [6] X. Qin, H. Wang, X. Wang, Z. Miao, L. Chen, W. Zhao, M. Shan, Q. Chen, *Sens. Actuators, B* 147 (2010) 593–598.
- [7] Y.-L. Yao, K.-K. Shiu, *Electroanalysis* 20 (2008) 1542–1548.
- [8] S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1083–1100.
- [9] J.C. Vidal, E.G. Ruiz, J.R. Castillo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 51–63.
- [10] J.C. Vidal, E.G. Ruiz, J. Espuelas, T. Aramendia, J.R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 273–280.
- [11] S. Singh, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 229–234.

- [12] S. Singh, P.R. Solanki, M.K. Pandey, B.D. Malhotra, *Anal. Chim. Acta* 568 (2006) 126–132.
- [13] P.R. Solanki, S. Singh, N. Prabhakar, M.K. Pandey, B.D. Malhotra, *J. Appl. Polym. Sci.* 105 (2007) 3211–3219.
- [14] J.C. Vidal, J. Espuelas, E.G. Ruiz, J.R. Castillo, *Talanta* 64 (2004) 655–664.
- [15] L.C.S. Chou, C.C. Liu, *Sens. Actuators, B* 110 (2005) 204–208.
- [16] J. Li, T. Peng, Y. Peng, *Electroanalysis* 15 (2003) 1031–1037.
- [17] X. Tan, M. Li, P. Cai, L. Luo, X. Zou, *Anal. Biochem.* 337 (2005) 111–120.
- [18] C. Dhand, S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 194–199.
- [19] A.I. Gopalan, K.P. Lee, D. Ragupathy, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2211–2217.
- [20] M. Yang, Y. Yang, H. Yang, G. Shen, R. Yu, *Biomaterials* 27 (2006) 246–255.
- [21] M. Yang, Y. Yang, F. Qu, Y. Lu, G. Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 211–217.
- [22] R. Manjunatha, D.H. Nagaraju, G.S. Suresh, J.S. Melo, S.F. D'Souza, T.V. Venkatesha, *J. Electroanal. Chem.* 651 (2011) 24–29.
- [23] R. Cui, H. Huang, Z. Yin, D. Gao, J.-J. Zhu, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1666–1673.
- [24] J.J. Gooding, V.G. Praig, E.A.H. Hall, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2396–2402.
- [25] Y. Yang, G. Yang, Y. Huang, H. Baia, X. Lu, *Colloids Surf., A* 340 (2009) 50–55.
- [26] W. Zhao, H. Wang, X. Qin, X. Wang, Z. Zhao, Z. Miao, L. Chen, M. Shan, Y. Fang, Q. Chen, *Talanta* 80 (2009) 1029–1033.
- [27] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* 603 (2007) 1–7.
- [28] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 5848–5866.
- [29] G. Li, J.M. Liao, G.Q. Hu, N.Z. Ma, P.J. Wu, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2140–2144.
- [30] Y.C. Tsai, S.Y. Chen, C.A. Lee, *Sens. Actuators, B* 135 (2008) 96–101.
- [31] M. Guo, J. Chen, J. Li, L. Nie, S. Yao, *Electroanalysis* 16 (2004) 1992–1998.
- [32] H.Y. Wang, S.L. Mu, *Sens. Actuators, B* 56 (1999) 22–30.
- [33] N. Peña, G. Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1190–1195.

1.1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución de Cloruro de poli(dialildimetilamonio) 0.25% (p/p): preparada por dilución de 0.625 mL del PDDA 20 % (p/p) (Sigma-Aldrich) en 50 mL de una disolución acuosa de NaCl 0.5 M.
- Dispersión de nanotubos de carbono modificados con poli(dialildimetilamonio) 0.8 mg mL⁻¹: se prepara a partir de 4 mg de MWCNTs (Nanolab, de 30 ± 15 nm de diámetro) modificados con PDDA en 5 mL de agua desionizada por agitación mediante ultrasonidos hasta la obtención de una dispersión homogénea.
- Disolución de ácido tetracloroaurico 1%: se disuelve la cantidad necesaria de H₂AuCl₄·3H₂O (Sigma) en 100 mL de agua desionizada. Filtrada a través de una membrana microporosa de 22 µm.
- Disolución de citrato sódico 1%: se disuelve la cantidad necesaria de citrato sódico (Panreac) en 100 mL de agua desionizada. Filtrada a través de una membrana microporosa de 22 µm.
- Disolución de Colesterol oxidasa (ChOx) 500 U mL⁻¹: se disuelven 15 mg de colesterol oxidasa, suministrada en polvo liofilizado (from Brevibacterium sp. EC 1.1.3.6, 34 U mg⁻¹ sólido, Sigma), en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4. A partir de esta disolución se preparan distintas alícuotas y se congelan a – 50 °C hasta su empleo. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de Peroxidasa de rábano (HRP) 1880 U mL⁻¹: se disuelven 5 mg de peroxidasa (tipo II, from Horseradish EC 1.11.1.7, 188 U mg⁻¹ sólido, Sigma) en 0.5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.

- Disolución de Nafion al 0.5 % (p/p): se prepara por dilución de 10 μL de Nafion 5% (p/p) (Aldrich) en 100 μL de etanol (Scharlau).
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.1 M: se preparada por dilución de 9 μL de H_2O_2 35% (Scharlau) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disoluciones de mediadores 0.1 M: se han preparado disoluciones de de ferrocianuro (Sigma), catecol (Fluka) e hidroquinona (Sigma), disolviendo la cantidad adecuada de los reactivos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado.
- Disolución patrón de hidroquinona 0.1 M: se disuelven 11 mg de hidroquinona (Sigma) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de colesterol 0.02 M: se disuelven 0.0386 g de colesterol (Sigma) en 0.2 mL de Triton X-100 (Merck) a 60 °C, y posteriormente se diluye en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado conteniendo Triton X-100 al 1%. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disoluciones patrón de compuestos interferentes: se disuelve la cantidad adecuada de cada compuesto en 1 mL de disolución reguladora. Se han preparado disoluciones de ácido ascórbico (Fluka) y ácido láctico (Sigma), ambas en concentración 0.1 M, glucosa (Panreac) en concentración 0.5 M y ácido úrico (Sigma) en concentración 2 mM. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M: se disuelve la cantidad adecuada de ambas sales en agua desionizada. El pH se ajusta al valor adecuado con NaOH 2 M.

- Disolución de trabajo para la determinación de colesterol con el biosensor monoenzimático: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 8.0, conteniendo la cantidad adecuada de Triton X-100 para que la concentración final sea del 1%.
- Disolución de trabajo para la determinación de colesterol con el biosensor bienzimático: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5, conteniendo las cantidades adecuadas de hidroquinona y Triton X-100 para que las concentraciones finales sean 0.5 mM y 1%, respectivamente.

1.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO (PDDA/MWCNTs)

En primer lugar, los nanotubos de carbono con extremos cerrados originales se someten a condiciones oxidantes de purificación con el fin de transformarlos en nanotubos con extremos abiertos, que presentan grupos carboxilo en las zonas donde se ha producido el daño oxidante. Para ello, 40 mg de MWCNTs se tratan con 20 mL de una mezcla H_2SO_4/HNO_3 (3:1) (Scharlau) durante 5 horas en ultrasonidos. Los nanotubos carboxilados resultantes se centrifugan en una centrifugadora MPW-65R a 14000 rpm y se lavan repetidamente con agua destilada hasta pH ~7 [Eitan, 2003]. El material resultante se caracterizó mediante Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) empleando un espectrofotómetro de Perkin-Elmer.

Una vez secos, la funcionalización con poli(dialildimetilamonio) (PDDA) se realiza por dispersión de 10 mg de nanotubos carboxilados en 20 mL de una disolución acuosa de cloruro de poli(dialildimetilamonio)(Sigma-Aldrich) al 0.25% (p/p) y NaCl (Scharlau) 0.5 M, empleando agitación con ultrasonidos, durante 30 minutos. A continuación, la suspensión resultante se centrifuga a 14000 rpm y se lava tres veces con agua destilada con el fin de eliminar el polímero no enlazado a la superficie del nanotubo [Cui, 2008]. Finalmente, 4 mg del material híbrido PDDA/MWCNTs se redispersan en 5 mL de agua desionizada mediante agitación ultrasonidos hasta la obtención de una

dispersión homogénea, la cual se sonica durante 5 minutos inmediatamente antes de su uso.

1.1.2.2. PREPARACIÓN DE ORO COLOIDAL

El procedimiento seguido para la preparación de oro coloidal se basa en un procedimiento anterior previamente optimizado por nuestro Grupo de Investigación [Manso, 2007].

En primer lugar se limpia escrupulosamente el material de vidrio a utilizar con agua regia, aclarando varias veces con agua desionizada previamente filtrada a vacío empleando un filtro de Nylon de tamaño de poro de 0.1 μm (Scharlab). El material se deja secar al aire durante 48 horas antes de su utilización.

Para preparar la dispersión de oro, se calientan hasta ebullición 100 mL de una disolución acuosa de HAuCl_4 al 0.01%, y se añaden 2.5 mL de la disolución de citrato sódico al 1%, agitando vigorosamente con una varilla de vidrio. Después de 15 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. Por último, la suspensión de oro coloidal se almacena en un frasco topacio a 4 °C.

1.1.2.3. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO ($\text{AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE}$)

Primero, antes de modificar la superficie del electrodo de carbono vitrificado se lleva a cabo su pretratamiento como se ha indicado en el Capítulo anterior.

A continuación, la superficie del electrodo se modifica con una alícuota de 10 μL de una dispersión de PDDA/MWCNTs (0.8 mg mL^{-1}), preparada según se ha indicado en el *Apartado 1.1.2.1*, y posteriormente se evapora el disolvente bajo una lámpara de radiación IR.

Tras dejar enfriar el electrodo a temperatura ambiente, se incorpora el oro coloidal, depositándose una alícuota de 10 μL de la suspensión descrita en el *Apartado 1.1.2.2*, durante 30 minutos en ausencia de luz y a 4 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente el electrodo modificado se aclara con agua, quedando preparado para la incorporación de las enzimas.

El material híbrido AuNPs/PDDA/MWCNTs se ha caracterizado mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes de microscopía fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía Electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid. Se ha empleado un microscopio electrónico de barrido de alta resolución con cañón de emisión de campo (Field Emisión Scanning Electron Microscope, FE-SEM), modelo JSM-6335F, y un microscopio electrónico de transmisión (Transmisión Electron Microscope, TEM), modelo JEM-2000 FX, ambos de la marca JEOL.

1.1.2.4. INMOVILIZACIÓN DE COLESTEROL OXIDASA Y COINMOVILIZACIÓN DE ChOx/HRP

A continuación, una vez preparado el electrodo, se procede a inmovilizar las enzimas sobre su superficie.

Para la preparación del biosensor monoenzimático, sobre la superficie del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE se deposita una alícuota de 5 μL de una disolución de colesterol oxidasa (ChOx) de 200 U mL^{-1} , preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4, y se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Con el fin de mejorar la selectividad, sobre la superficie del biosensor se depositan 5 μL de Nafion 0.5% y se deja evaporar a temperatura ambiente.

De forma similar, para la preparación del biosensor bienzimático se deposita una alícuota de 5 μL de una disolución mezcla de peroxidasa de rábano (HRP) 940 U mL^{-1} y colesterol oxidasa (ChOx) 200 U mL^{-1} .

Finalmente los biosensores se aclaran con agua desionizada y se almacenan en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, dejando esperar

un tiempo para que alcancen la temperatura ambiente antes de realizar las medidas electroquímicas.

En la *Figura 43* se muestra el esquema seguido para la preparación de ambos biosensores de colesterol oxidasa, así como las reacciones enzimáticas que tienen lugar al adicionar el sustrato de la colesterol oxidasa.

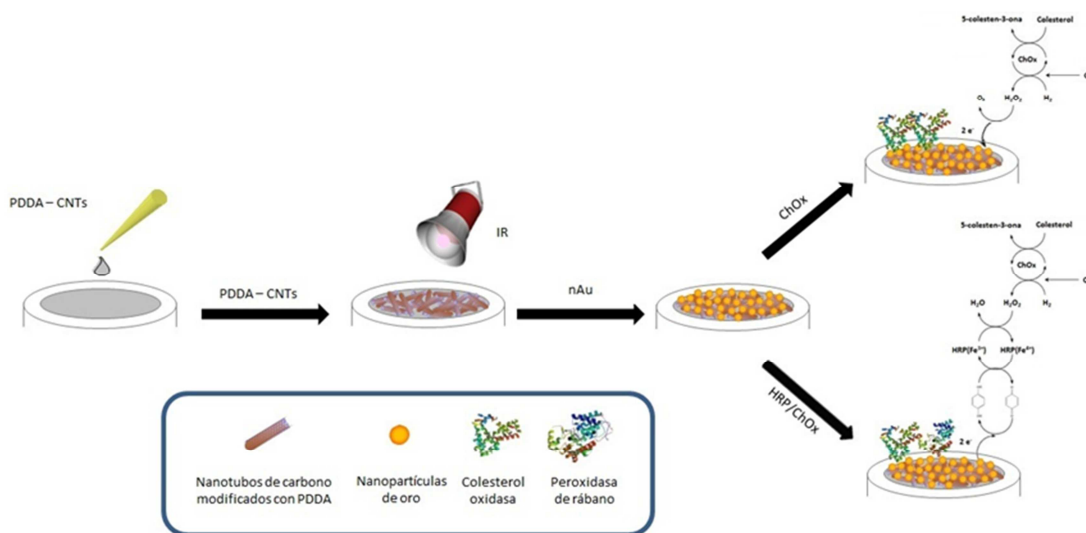


Figura 43. Esquema de la preparación de los biosensores de colesterol basados en el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Las medidas amperométricas y voltamperométricas se han realizado empleando un potenciostato BAS 100B, provisto de un soporte BAS C2 EF-1080 y controlado mediante el software de análisis electroquímico BAS 100W versión 2.0. Para las medidas de impedancia electroquímica se ha empleado un potenciostato μ Autolab tipo III, controlado por el software FRA2 (Ecochimie) (*Figura 44*). El montaje potenciostático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo de carbono vitrificado (Metrohm 6.084.010, de 3 mm de diámetro), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BAS MF-2063) y un electrodo auxiliar de alambre de Pt (BAS MW-1032), empleándose una célula electroquímica (BAS VC-2) de 5 mL.



Figura 44. Potenciostato μ Autolab tipo III.

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica y amperometría en disoluciones agitadas. Además, la caracterización del biosensor desarrollado se ha llevado a cabo por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

1.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Para obtener las curvas intensidad – potencial se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 5 mL de la disolución de trabajo correspondiente conteniendo H_2O_2 en la concentración deseada, y se mantiene con agitación magnética constante hasta el momento en que se procede a la medida. Tras seleccionarse los potenciales inicial, de retorno y final, así como la velocidad de barrido, se procede al registro del voltamperograma cíclico correspondiente con la disolución en reposo.

1.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

Para obtener los amperogramas, se introducen los tres electrodos en la célula de medida, que contiene 5 mL de la disolución de trabajo correspondiente, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dura el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona la cantidad adecuada de H_2O_2 o colesterol, y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el

estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

1.1.3.3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUIMICA

Para obtener los diagramas de Nyquist se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 5 mL de una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5mM en KCl 0.1M. Las medidas se llevan a cabo al potencial de equilibrio (correspondiente a paso de corriente cero) del sistema en estudio (E_{dc}), con una amplitud de excitación sinusoidal (E_0) de 10 mV. La impedancia se midió a 50 frecuencias armónicas desde 0.04 Hz a 10^5 Hz siguiendo una distribución logarítmica.

1.1.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

Los biosensores desarrollados se han empleado para la determinación de colesterol en muestras de suero humano a las que se adicionó colesterol a tres niveles de concentración: 2, 5 y 7 mM. Con este fin, el suero sólido comercial (Sigma) se reconstituye en 1 mL de la disolución de colesterol correspondiente y se mezcla cuidadosamente hasta su total disolución.

1.1.4.1. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

La determinación de colesterol se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado y, con el fin de minimizar el efecto matriz, empleando el método de adiciones estándar. Para ello, el biosensor monoenzimático se sumerge en la célula de trabajo que contiene 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 8.0 conteniendo Triton X-100 1%, y se aplica un potencial de 0.6 V (vs. Ag/AgCl), agitando mecánicamente a velocidad constante. Por su parte, el biosensor bienzimático se sumerge en la célula de trabajo que contiene 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5 conteniendo hidroquinona 0.5 mM y Triton X-100 1%, y se aplica un potencial de -0.05 V (vs. Ag/AgCl), agitando mecánicamente a velocidad constante.

En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta una alícuota de 100 μL de la disolución de muestra a la célula de medida. A continuación se realizan adiciones sucesivas de alícuotas de 25 μL de una disolución patrón de colesterol 0.02 M, monitorizándose la intensidad de corriente de oxidación del H_2O_2 o de reducción de la quinona, generados en la reacción enzimática que se produce en la superficie de los biosensores mono y bienzimáticos, respectivamente, las cuales se relacionan con la concentración de colesterol presente en la muestra.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La preparación de nanopartículas de oro generalmente implica la reducción química de una sal de oro en medio acuoso en presencia de un agente estabilizante o protector adecuado, el cual se une a la superficie de las nanopartículas aumentando su estabilidad. Las dispersiones de nanopartículas en presencia de un estabilizador se mantienen inalteradas durante largo tiempo a temperatura ambiente, no observándose precipitación del coloide al cabo de varios meses. Como agentes estabilizantes se ha empleado una gran variedad de compuestos. Entre ellos, el citrato es el más común, ya que el procedimiento de obtención de nanopartículas de oro basado en el empleo de citrato como reductor es el más utilizado, probablemente debido a su sencillez y los buenos resultados que proporciona. En las dispersiones obtenidas, el citrato impide la formación de agregados [Cai, 2001] y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas puede controlarse en función de la relación Au(III)/citrato.

En la *Figura 45* se representan las etapas implicadas en la formación de nanopartículas de oro: la nucleación, el crecimiento de las partículas y la sobresaturación. Antes de la adición del agente reductor sólo hay iones de oro en la disolución. Inmediatamente después de adicionar el reductor, se produce un crecimiento brusco en el número de núcleos de oro icosaédrico, constituidos por 11 átomos de oro, que tienden a agruparse con el objeto de disminuir la sobresaturación de átomos de oro en disolución. Después de este proceso tiene lugar el crecimiento de las partículas hasta que todos los átomos de la disolución se han unido a los núcleos ya formados, dando lugar a la aparición de agregados. La cantidad de agente reductor adicionado determina el número y tamaño de las partículas de oro obtenidas. Así, una cantidad elevada de reductor da lugar a la formación de un gran número de centros de nucleación iniciales y, por tanto, a la obtención de un mayor número de partículas de oro de menor tamaño.

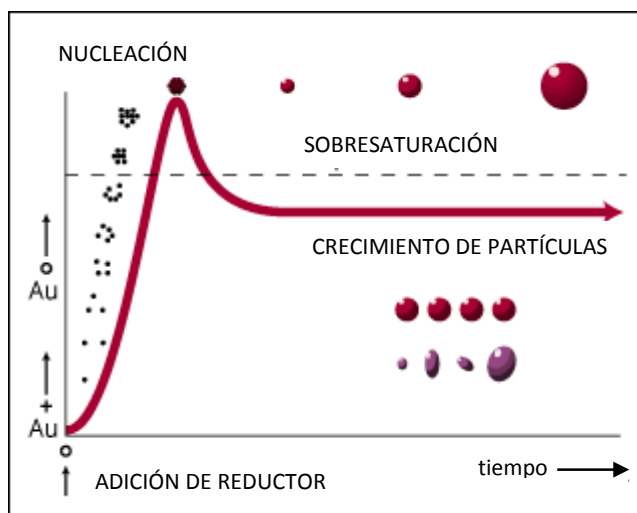


Figura 45. Esquema de la formación de nanopartículas de oro.

Una vez finalizado el crecimiento de las partículas, la morfología de éstas será esférica y, si el proceso ha tenido lugar de forma adecuada, todas serán del mismo tamaño (monodispersas). Debido al fenómeno de resonancia de plasmón de la luz visible sobre las nanopartículas de oro, la dispersión será de color rojo granate. La aparición de una coloración púrpura indica que se han formado agregados, fenómeno que origina la producción de nanopartículas de forma y tamaño irreproducible. Una limpieza deficiente del material de vidrio empleado en la preparación del oro coloidal, hace que los restos de partículas sólidas puedan actuar como centros de nucleación adicionales y como agentes floculantes del coloide formado. Por otro lado, las nanopartículas preparadas de acuerdo con este procedimiento poseen carga superficial negativa como consecuencia de la débil unión al anión citrato empleado como reductor. Debido a la carga, las nanopartículas de oro se repelen entre sí, manteniéndose en suspensión indefinidamente, y además pueden interactuar electrostáticamente con soportes con carga opuesta.

Debido a los cambios de color que se producen en función del tamaño de las nanopartículas, la caracterización de los coloides de oro puede realizarse mediante espectrofotometría UV-visible. Como ejemplo, en la *Figura 46* se muestra un espectro de absorción con un máximo a 519 nm, característico de las suspensiones de nanopartículas de oro con un tamaño medio en torno a 20 nm [Wang, 2006]_b.

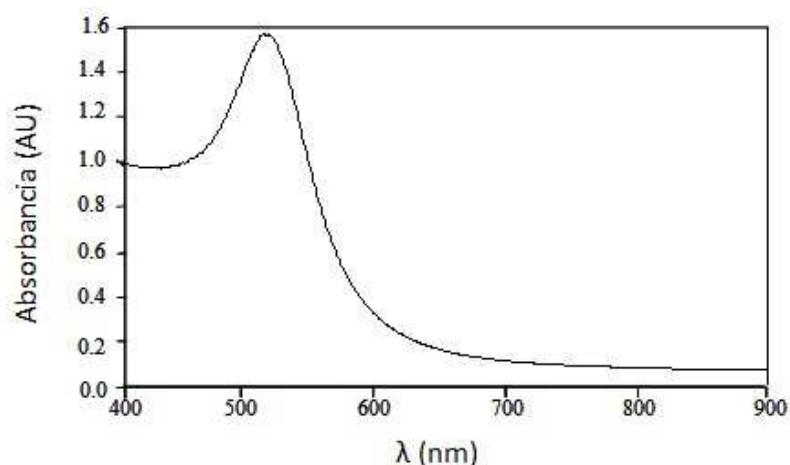


Figura 46. *Espectro de absorción del oro coloidal.*

1.2.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO PDDA/MWCNTs

Como ya se ha comentado, uno de los mayores problemas prácticos que presenta el empleo de nanotubos de carbono es su hidrofobicidad, debido a que su elevada área superficial, con enlaces π continuos, les confiere una gran tendencia a aglomerarse formando “manojos” (“bundles”) de nanotubos que interactúan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals [Vairavapandian, 2008]. Además, independientemente del método empleado para su síntesis, los nanotubos de carbono contienen carbono amorfo e impurezas metálicas que pueden alterar sus propiedades [Aqel, en prensa]. Prácticamente desde el comienzo del empleo de los nanotubos de carbono se vienen utilizando tratamientos oxidativos con ácidos para su limpieza y transformación. Estos tratamientos eliminan impurezas, acortan la longitud de los nanotubos y modifican su pared por generación de grupos carboxilo e hidroxilo superficiales. Los grupos así generados mejoran la compatibilidad de este nanomaterial con el disolvente, reduciendo su tendencia a aglomerarse, pero además sirven de puntos de inicio para una posterior funcionalización de los nanotubos, y como zonas cargadas para posibles interacciones electrostáticas. Entre estas últimas, una de las que han sido descritas en la bibliografía es la que tiene lugar con el polielectrólito PDDA, cargado positivamente.

En este trabajo, una vez aplicado el método de oxidación de los nanotubos de carbono descrito en la Parte experimental, por agitación ultrasónica en una mezcla

H₂SO₄/HNO₃ (3:1), se caracterizó el material resultante mediante Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR). En la *Figura 47* se muestran los espectros de absorción obtenidos.

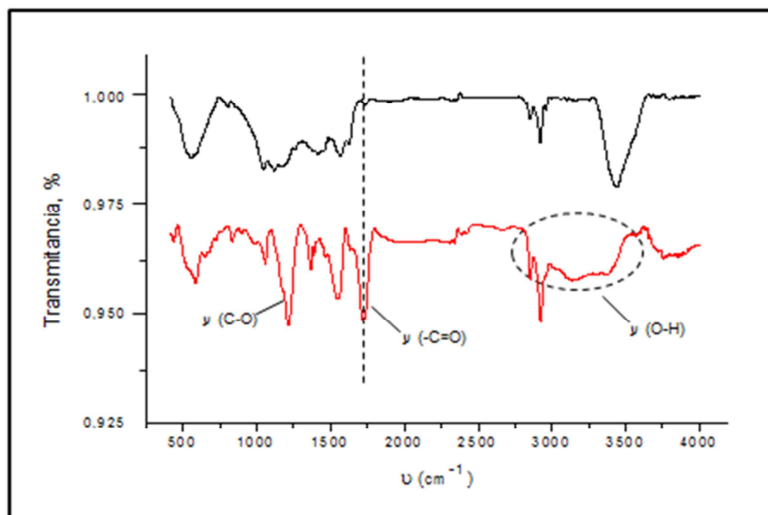


Figura 47. Espectros FTIR de los nanotubos de carbono: 1) sin aplicar ningún tratamiento (-); 2) después del tratamiento con mezcla H₂SO₄/HNO₃ (3:1) y agitación US (-).

Como puede observarse, cuando se lleva a cabo el tratamiento oxidativo aparece una banda a 1725 cm⁻¹, correspondiente a la tensión de vibración fundamental característica de los grupos carbonilo (-C=O), y una banda a 1200 cm⁻¹ que se puede asignar a la vibración fundamental del enlace C-O. Asimismo se observa la aparición de una banda ancha entre 2800 y 3500 cm⁻¹ que corresponde a la tensión de vibración de los grupos O-H. Los resultados obtenidos confirman la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo cuando los nanotubos de carbono se someten al tratamiento oxidativo. Además, cuando los nanotubos no son sometidos al tratamiento con ácidos se observa un solapamiento de las bandas, lo que puede ser indicativo de presencia de impurezas carbonáceas en los nanotubos originales.

Con el fin de inmovilizar las nanopartículas de oro sobre la superficie de los nanotubos de carbono, estos fueron modificados con PDDA. Como se señaló en la Introducción, el “wrapping” con polímeros hidrofílicos facilita la solubilización estable de los nanotubos de carbono en disolución acuosa, preservando sus propiedades

intrínsecas, debido a que queda escondida la superficie hidrofóbica de estos y expuesta la superficie hidrofílica del polielectrólito. En la *Figura 48* se muestran los nanotubos de carbono sin oxidar y los modificados con PDDA justo cuando se someten a agitación por ultrasonidos y después de 5 min de haber sido agitados, observándose que la modificación de nanotubos con PDDA permite obtener una suspensión perfectamente homogénea.

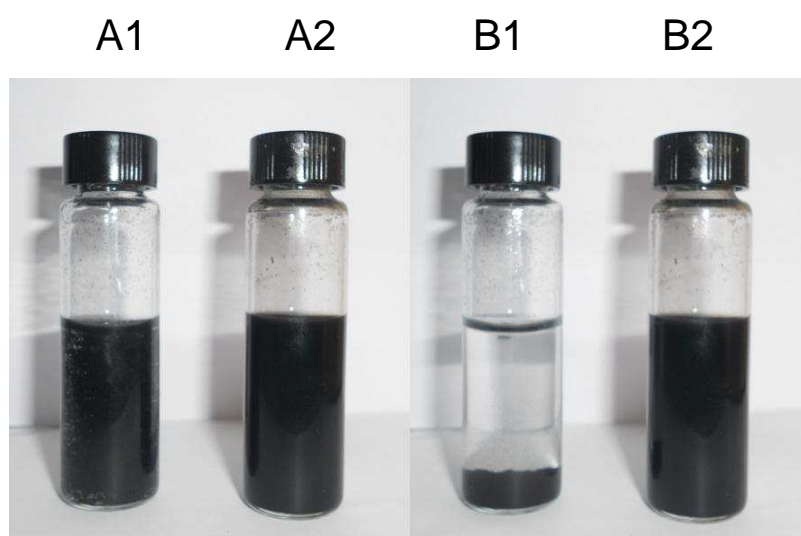


Figura 48. Suspensiones en agua de nanotubos de carbono agitadas por US: (A) inmediatamente después de la agitación US; (B) después de 5 min desde la agitación. (1) sin tratar con ácidos ni PDDA; (2) tratados con ácidos y con PDDA.

1.2.2. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

En la *Figura 49* se muestran los voltamperogramas cíclicos de una disolución de H_2SO_4 0.1 M obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono sin PDDA y con nanopartículas de oro (arriba), y modificados con nanotubos de carbono, PDDA y nanopartículas de oro (abajo). Como puede observarse, las curvas presentan la forma habitual de los electrodos de oro, apareciendo un pico de oxidación correspondiente a la formación de óxidos de oro y una señal catódica a ~ 0.5 V, debida a la reducción de los óxidos formados en el barrido anódico. Cuando se emplean los nanotubos carboxilados en ausencia de PDDA, la señal catódica disminuye a medida que se registran ciclos consecutivos, lo que se debe

probablemente a la pérdida paulatina de nanopartículas de oro. Sin embargo, cuando se emplean nanotubos de carbono modificados con PDDA, se obtienen una señal de reducción de los óxidos de oro de mayor intensidad, y que permanece constante a pesar de realizarse cinco barridos consecutivos, con una RSD de 3.3%. La mayor estabilidad del electrodo preparado con PDDA/MWCNTs indica una mejor retención de las nanopartículas de oro cuando éstas interactúan electrostáticamente con el recubrimiento polimérico.

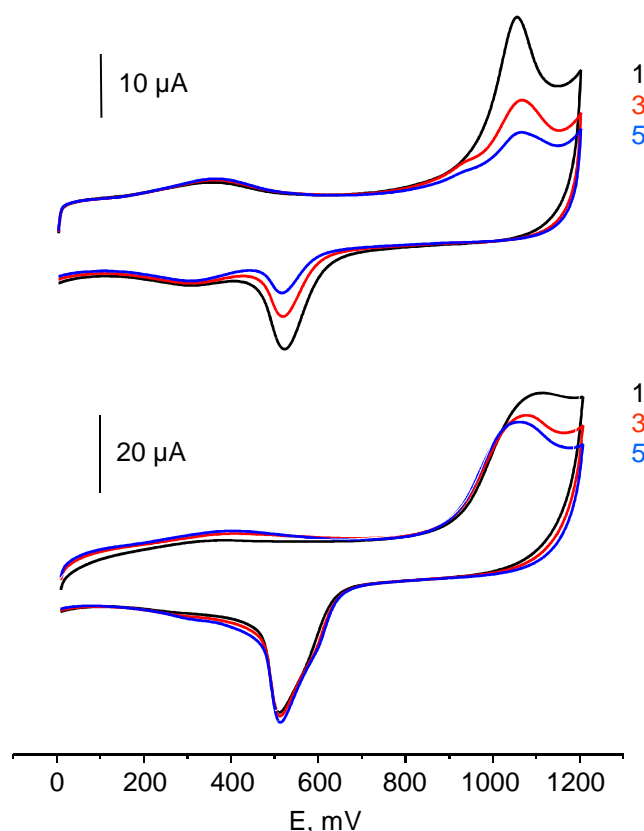


Figura 49. Voltamperogramas cíclicos en H_2SO_4 0.1 M tras 1,3 y 5 ciclos consecutivos sobre: AuNPs/MWCNTs/GCE (arriba) y AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (abajo); $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Se estudió el comportamiento electroquímico del peróxido de hidrógeno sobre los electrodos AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, con los resultados representados en la Figura 50, en la que se comparan las respuestas obtenidas sobre dicho electrodo con las correspondientes para el GCE y el PDDA/MWCNTs/GCE.

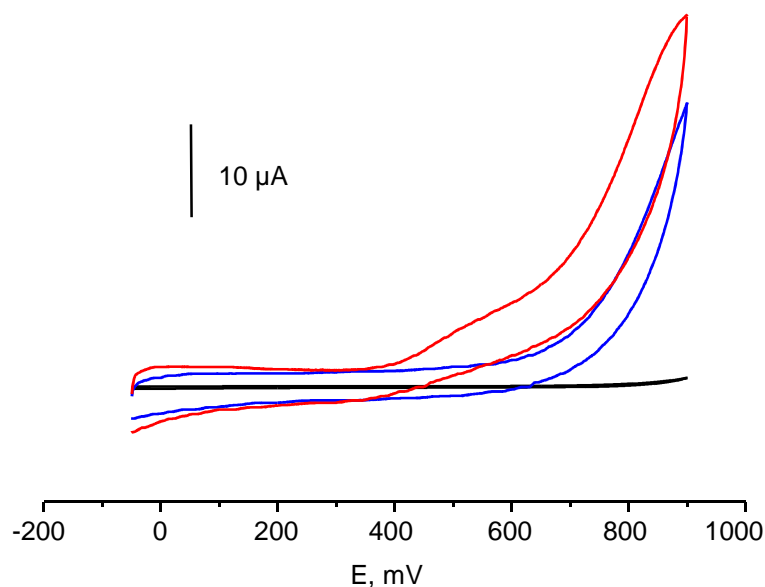


Figura 50. Voltamperogramas cíclicos de H_2O_2 2 mM sobre los electrodos: GCE (-), PDDA/MWCNTs/GCE (-) y AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (-). Medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.5; $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como puede observarse, el electrodo de carbono vitrificado sin modificar no proporciona respuestas analíticas de utilidad para el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, cuando se utiliza el electrodo modificado con PDDA/MWCNTs se aprecia un incremento de la corriente de oxidación, efecto que se ve magnificado con el empleo del material híbrido AuNPs/PDDA/MWCNTs como consecuencia del efecto sinérgico que se produce en la mezcla.

1.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Se optimizaron todas las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE empleando H_2O_2 como analito, con el objetivo de obtener la mejor señal electroquímica de oxidación. Estas variables fueron: la composición del material electródico (cantidad de PDDA/MWCNTs y tiempo de incubación de la alícuota de la suspensión de oro coloidal) y las condiciones experimentales involucradas en la detección de H_2O_2 (potencial de detección y pH del medio).

Composición del material electrodico

En primer lugar se evaluó la influencia de la cantidad de PDDA/MWCNTs depositada en la superficie del electrodo sobre la respuesta amperométrica de las disoluciones de H_2O_2 (*Figura 1a* del artículo, pág. 174 del mismo). Como puede observarse, la corriente en estado estacionario aumenta con dicha cantidad hasta un valor de 4 μg , permaneciendo prácticamente constante para valores superiores. Hay que decir que cuando se emplearon 12 μg de PDDA/MWCNTs, máxima cantidad ensayada, se observó el desprendimiento de parte del recubrimiento. Estos resultados han llevado a elegir una cantidad de 8 μg como óptima para obtener una completa modificación de la superficie electrodica, así como un recubrimiento mecánicamente estable.

Para la preparación del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, tal como se describe en la Parte experimental, se deposita un volumen de la suspensión de nanopartículas de oro sobre el electrodo modificado con MWCNTs/PDDA, dejando incubar a 4 °C durante un tiempo determinado. En la *Figura 2* del artículo (pág. 174 del mismo) se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos cuando se utilizan electrodos preparados por aplicación de distintos tiempos de incubación de las AuNPs. Como puede observarse, las corrientes de los picos anódico y catódico, correspondientes a la oxidación del oro y a la reducción de los óxidos de oro, respectivamente, aumentan con el tiempo de incubación, lo que indica un incremento de la cantidad de nanopartículas depositadas sobre los MWCNTs a medida que aumenta dicho periodo. Puede apreciarse también cómo a los tiempos más elevados, el pico de reducción aparece desdoblado, siendo estas dos señales electroquímicas debidas probablemente a la reducción de dos tipos de óxido de oro formados previamente en el barrido de oxidación del electrodo.

Con el fin de obtener la mejor corriente de oxidación de peróxido de hidrógeno, se optimizó la cantidad de nanopartículas de oro depositadas sobre el electrodo PDDA/MWCNTs/GCE. Para ello se evaluó la corriente en estado estacionario obtenida empleando electrodos modificados con distintos tiempos de incubación (*Figura 1b* del artículo, pág. 174 del mismo). Como puede observarse, la corriente aumenta

rápidamente hasta los 40 min, lo que se atribuye a la mejora de la cinética de transferencia electrónica a medida que es mayor el contenido de nanopartículas de oro, debido al efecto sinérgico que tiene lugar en el material híbrido con los nanotubos de carbono.

La disminución de señal que se observa para tiempos de incubación superiores se debe probablemente al aumento de la resistencia del electrodo producida por la disminución de los sitios sensores de carbono en el material electródico [Carralero, 2006]. Para entender este comportamiento, en la *Figura 51* se muestran las micrografías de barrido electrónico obtenidas para electrodos AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, preparados para tiempos de incubación de 30 y 60 min, observándose que para un tiempo de 60 min los nanotubos de carbono quedan prácticamente ocultos por el recubrimiento de oro.

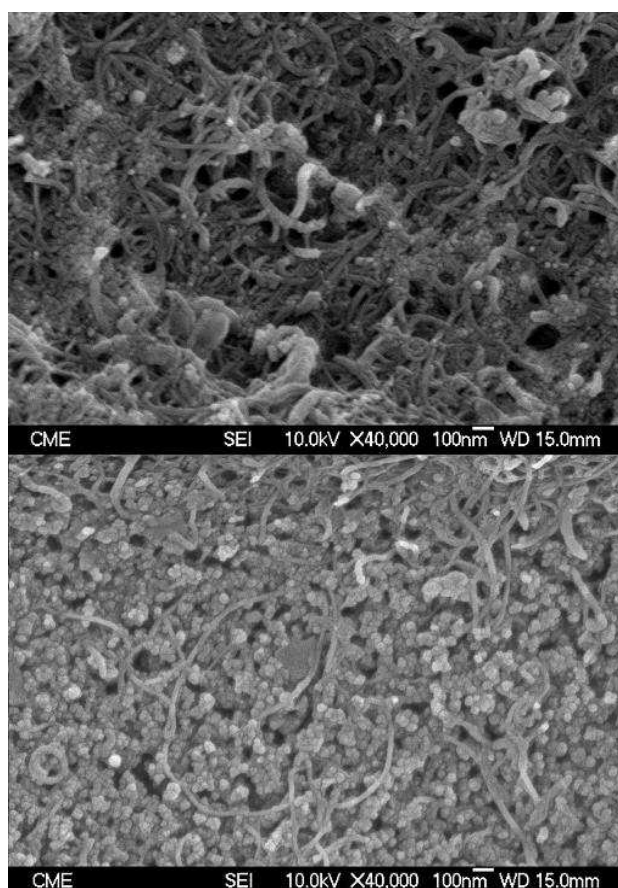


Figura 51. Micrografías de barrido electrónico obtenidas para electrodos AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, preparados para tiempos de incubación de 30 (arriba) y 60 min (abajo).

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, y como compromiso entre la mejor sensibilidad y el empleo de un tiempo del proceso no excesivamente largo, se seleccionó un tiempo de incubación de 30 min.

Condiciones de detección de peróxido de hidrógeno

Con objeto de elegir el potencial más adecuado para llevar a cabo la determinación de H_2O_2 empleando el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, se estudió la influencia que sobre la respuesta amperométrica tiene la variación del potencial aplicado al electrodo en un intervalo de 0 a 800 mV. La *Figura 4* del artículo (pág. 175 del mismo) muestra los resultados obtenidos comparados con los correspondientes a los electrodos GCE y PDDA/MWCNTs/GCE.

Como puede observarse, cuando se emplea el electrodo GCE sin modificar no se obtienen corrientes de oxidación significativas en el intervalo estudiado. Sin embargo, cuando se incorporan al electrodo los nanotubos de carbono modificados con PDDA, se observa un aumento considerable en las corrientes de oxidación obtenidas para valores de potencial mayores que +0.4 V lo cual indica el efecto electrocatalítico intenso que ejercen los nanotubos de carbono hacia la oxidación del peróxido de hidrógeno. Finalmente, la incorporación de nanopartículas de oro a la superficie del electrodo PDDA/MWCNTs/GCE produce un gran aumento en la corriente, lo que sugiere un efecto sinérgico de ambos componentes, con una cinética más rápida en el proceso de oxidación del H_2O_2 y un aumento en el área superficial activa del electrodo. Con el fin de obtener la mejor sensibilidad en la determinación del analito, para los siguientes estudios se seleccionó un potencial de detección de +0.6 V.

Por último, en la *Figura 1c* del artículo (pág. 174 del mismo) se muestra la influencia que tiene el pH del medio en la respuesta amperométrica obtenida en el intervalo 6.5 – 9.0. Con el fin de obtener la mayor sensibilidad se seleccionó un valor de pH de 8.0 para estudios posteriores, ya que para valores de pH superiores no se observa mejora significativa en la sensibilidad.

Caracterización

El electrodo modificado AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE se caracterizó electroquímicamente por voltamperometría cíclica en una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM y KCl 0.1 M a diferentes velocidades de barrido de potencial. En la *Figura 52* se han representado los voltamperogramas obtenidos. Como puede observarse, aparecen picos de oxidación y de reducción bien definidos característicos de un sistema cuasi-reversible. Por otro lado, la intensidad del pico de oxidación aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial en todo el intervalo de velocidades estudiado, lo que indica un control difusivo de la corriente del proceso electrodo. El área electroquímica se calculó a partir de la pendiente de la representación i_p vs. $v^{1/2}$, teniendo en cuenta la ecuación de Randles:

$$i_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2}$$

donde " i_p " es la corriente de pico, " n " es el número de electrones implicados en la transferencia, " A " es el área electroquímica del electrodo, " D " es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva ($7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), " C " es la concentración en disolución de la misma especie y " v " es la velocidad de barrido de potencial. El valor obtenido para el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE fue $0.232 \pm 0.005 \text{ cm}^2$ ($n=5$). De forma similar, las áreas electroquímicas calculadas para los electrodos GCE y PDDA/MWCNTs/GCE fueron $0.145 \pm 0.007 \text{ cm}^2$ ($n=5$) y $0.227 \pm 0.004 \text{ cm}^2$ ($n=5$), respectivamente. Como era de esperar, el área electroquímica aumenta sensiblemente en presencia de nanotubos de carbono, siendo menos significativo el incremento observado por la presencia de AuNPs.

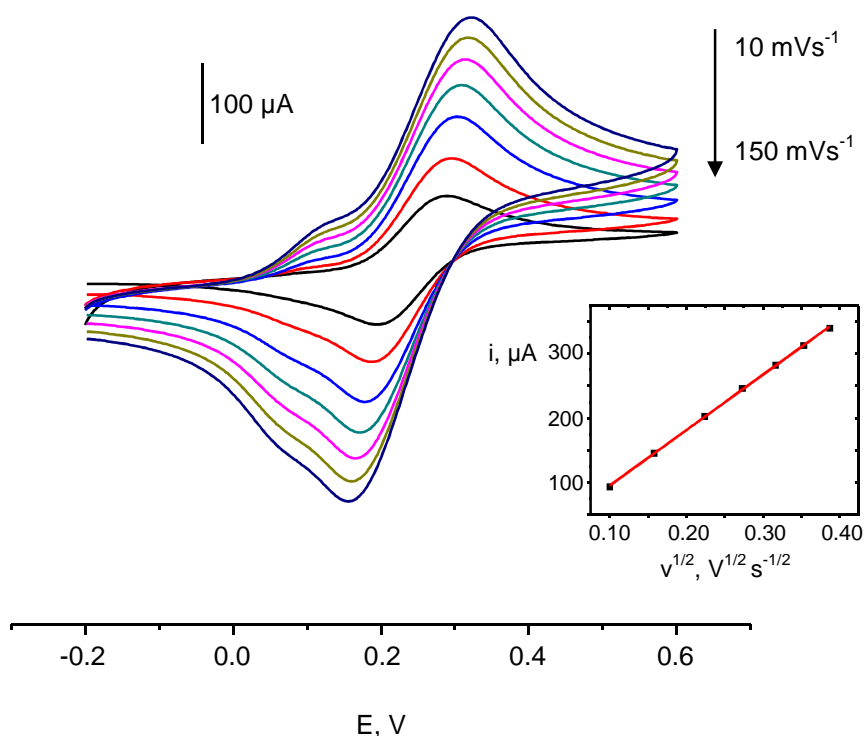


Figura 52. Efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta en voltamperometría cíclica de disoluciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Recuadro: Variación de la corriente de oxidación con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial.

La caracterización microscópica del material AuNPs/PDDA/MWCNTs se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Como ejemplo, en la *Figura 53* se muestra una micrografía de transmisión en la que se observa la presencia de una elevada cantidad de nanopartículas de oro adheridas a las paredes de los nanotubos de carbono. El conjunto de las imágenes obtenidas por TEM permitió calcular el tamaño medio de las nanopartículas de oro, que fue de 20 ± 3 nm ($n= 150$).

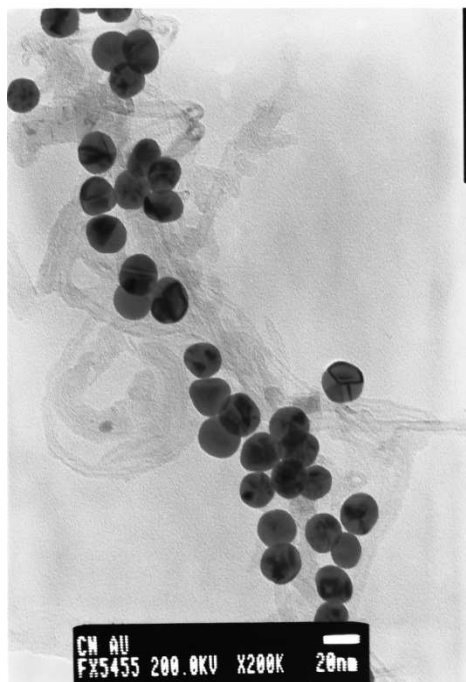


Figura 53. Micrografía de transmisión electrónica (TEM) del material AuNPs/PDDA/MWCNTs.

1.2.2.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE H₂O₂

Empleando las condiciones óptimas mencionadas, se desarrolló un método para la determinación de H₂O₂ a partir del correspondiente calibrado. En la *Figura 54* se comparan las señales amperométricas obtenidas para adiciones de H₂O₂ en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.2 y 1.0 mM, aplicando un potencial de detección de +0.6 V, y empleando los electrodos PDDA/MWCNTs/GCE y AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Puede apreciarse una mayor magnitud de las respuestas obtenidas con el segundo electrodo, debido a la presencia de las nanopartículas de oro. Asimismo, se han representado también los calibrados correspondientes. Los valores de las pendientes obtenidas para los electrodos construidos en ausencia y en presencia de AuNPs fueron 2.22 y 7.27 $\mu\text{A mM}^{-1}$, respectivamente. Este último valor es mayor que los reportados con otras superficies electródicas basadas en nanotubos de carbono y nanopartículas de oro, como es, por ejemplo, el caso de un electrodo basado en la mezcla compósita de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y teflón (4.3 $\mu\text{A mM}^{-1}$) [Manso, 2007], y el de un electrodo preparado por

electrodeposición de nanopartículas de oro sobre nanotubos de carbono con quitosan ($2.35 \mu\text{A mM}^{-1}$) [Yang, 2009]_b. Además, otra característica destacable del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE es la rapidez de respuesta, alcanzándose el 95% de la corriente en estado estacionario en aproximadamente 4 s.

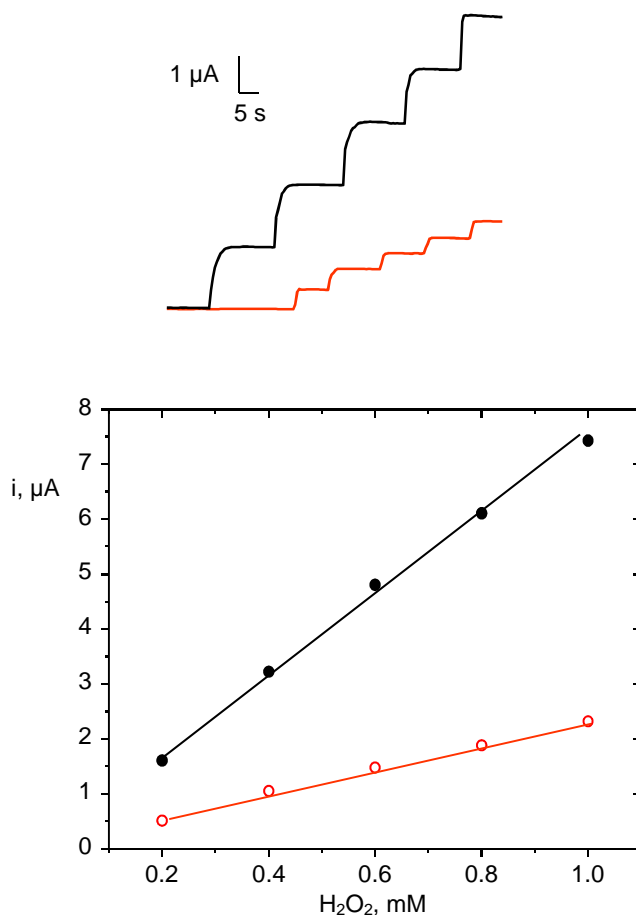


Figura 54. Señales amperométricas y calibrados obtenidos para H_2O_2 sobre los electrodos PDDA/MWCNTs/GCE (—) y AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (—). Medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 8.0; $E_{ap}=0.6$ V.

1.2.3. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR $\text{ChO}_x/\text{AuNPs}/\text{PDDA}/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$

Los buenos resultados obtenidos para la medida de la respuesta de oxidación de H_2O_2 sobre el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE hace de éste una superficie adecuada para la preparación de biosensores basados en enzimas oxidasas.

Recientemente, distintos sustratos electrónicos basados en nanotubos de carbono o en sus híbridos con nanopartículas metálicas, empleando distintos métodos de inmovilización, han demostrado ser analíticamente útiles para la preparación de biosensores de colesterol, habiéndose observado una mayor estabilidad sobre estas superficies con respecto a los electrodos convencionales [Dhand, 2008; Gopalan, 2009; Yang, 2006; Yang, 2006b; Manjunatha, 2011]. Por este motivo, con el fin de demostrar la utilidad de la matriz electrónica desarrollada, se eligió la enzima colesterol oxidasa para llevar a cabo la preparación de un biosensor electroquímico. En este diseño, la enzima ChOx se inmoviliza sobre la superficie del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE aprovechando la capacidad de adsorción de las nanopartículas de oro [Pingarrón, 2008].

En la *Figura 55* se muestra el esquema seguido para la preparación del biosensor, así como las reacciones que tienen lugar para la detección electroquímica de colesterol mediante la monitorización electroquímica del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática.

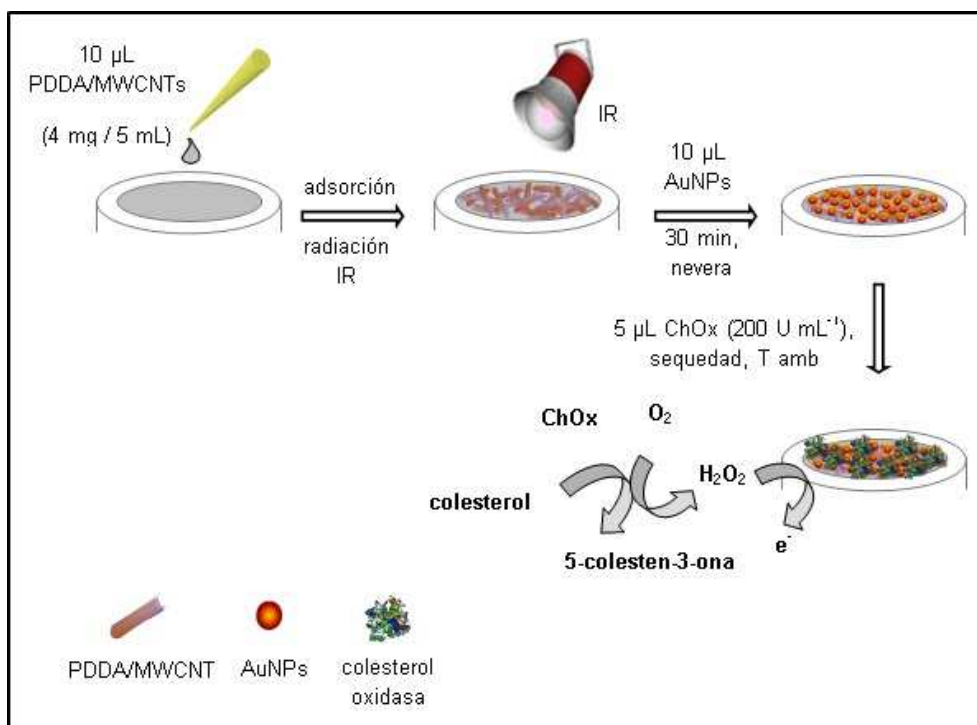


Figura 55. Esquema de la preparación del biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y de la detección electroquímica de colesterol.

1.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Todas las variables implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor fueron optimizadas con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad y el intervalo de respuesta más alto para la determinación de colesterol. A continuación se describen los resultados obtenidos.

Tiempo de incubación de la suspensión de oro coloidal

Una vez preparado el biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, se investigó de nuevo la cantidad de nanopartículas adsorbidas sobre la superficie eléctrica, ya que éstas ejercen un papel fundamental en la inmovilización de la enzima. Como puede observarse en la *Figura 56*, los resultados obtenidos en este estudio son similares a los descritos anteriormente para la determinación de peróxido de hidrógeno, por lo que se eligió también un tiempo de incubación de 30 min con el fin de garantizar la mayor sensibilidad en la determinación de colesterol.

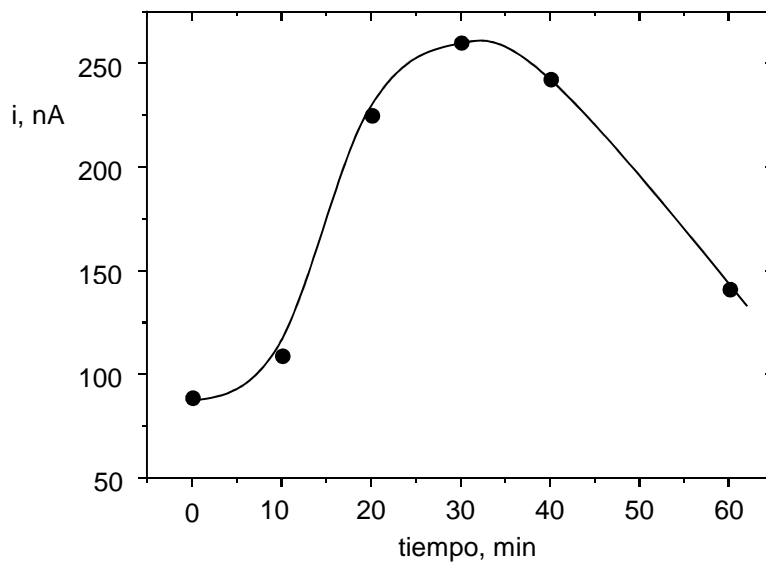


Figura 56. Influencia del tiempo de incubación de las nanopartículas de oro depositadas sobre la respuesta del biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 8.0; $E_{ap}=0.6$ V.

Cantidad de enzima

En primer lugar, se estudió la influencia de la cantidad de colesterol oxidasa depositada sobre la superficie electródica, evaluando la variación de la corriente en estado estacionario obtenida para disoluciones de colesterol 0.1 mM cuando se mide a +0.6 V con distintos biosensores preparados en el intervalo comprendido entre 0.25 y 2.5 unidades de enzima. Como puede observarse en la *Figura 57*, la corriente amperométrica aumenta hasta un valor de 1 U, valor a partir del cual permanece prácticamente constante, seleccionándose este valor como óptimo para estudios posteriores.

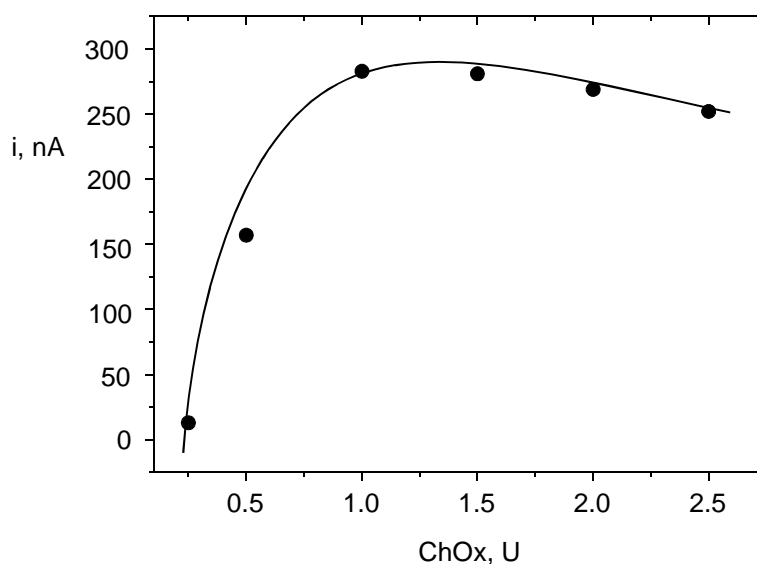


Figura 57. Influencia de la cantidad de enzima colesterol oxidasa sobre la respuesta del biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 8.0; $E_{ap}=0.6$ V.

Influencia de la incorporación de una película de Nafion

Debido a que el potencial de detección utilizado es relativamente elevado, y con el fin de minimizar posibles interferencias de especies fácilmente oxidables, se estudió la incorporación de una película de Nafion sobre la superficie del biosensor, ya que, como es bien conocido, este polímero (tetrafluoroetileno sulfonado), de naturaleza aniónica, impide el acceso a la superficie del electrodo de especies cargadas negativamente, como es el caso de los ácidos ascórbico y úrico disociados al pH

adecuado. Sin embargo, debido a que el Nafion puede suponer un impedimento para la difusión del colesterol hacia el electrodo, se ha optimizado la concentración de la disolución del polímero de la que se incorporan 5 μ L a la superficie electródica, con el objetivo de aumentar la selectividad sin disminuir excesivamente la sensibilidad de la detección. La *Figura 58* muestra la variación de la señal amperométrica con la concentración de Nafion, observándose una disminución rápida de la corriente con dicha concentración. Este efecto se debe a que el Nafion posee una estructura formada por canales de 4 nm que deben ser atravesados por el colesterol para alcanzar la superficie electródica donde se encuentra inmovilizada la enzima. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha seleccionado una concentración de Nafion del 0.5%, que sólo supone una pérdida del 9% de la señal.

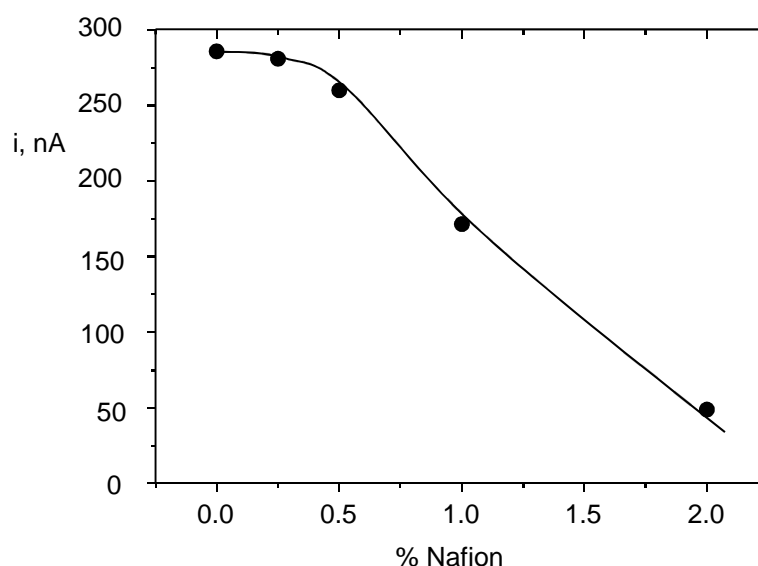


Figura 58. Influencia de la concentración de Nafion en la disolución utilizada para recubrir el electrodo sobre la respuesta del biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 8.0; $E_{ap} = 0.6$ V.

Una vez optimizada la concentración de la disolución de Nafion, se investigó su influencia sobre la respuesta amperométrica de los ácidos ascórbico y úrico, con los resultados representados en la *Figura 6* del artículo (pág. 176 del mismo) puede observarse que en ausencia de Nafion, existe una fuerte interferencia al potencial de

detección (+600 mV) por parte de ambos ácidos. Sin embargo, estas interferencias son minimizadas notablemente cuando se emplea el recubrimiento con Nafion.

Influencia del pH

Se estudió la influencia del pH en el intervalo de 6.5 a 9.0 (*Figura 59*), sobre la respuesta del biosensor, observándose la mayor sensibilidad para un valor de pH 8.0. Para valores superiores de pH la sensibilidad disminuye debido a la menor actividad de la enzima colesterol oxidasa en medios más alcalinos [Li, 2005].

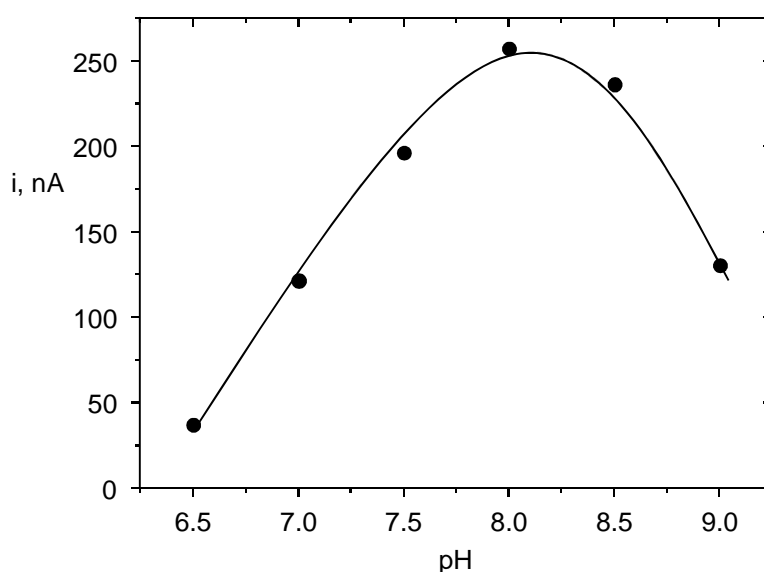


Figura 59. Influencia del pH sobre la respuesta del biosensor

ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1%; $E_{ap}=0.6$ V.

A modo de ejemplo, en la *Figura 60* se muestra la respuesta amperométrica obtenida con el biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE bajo las condiciones optimizadas.

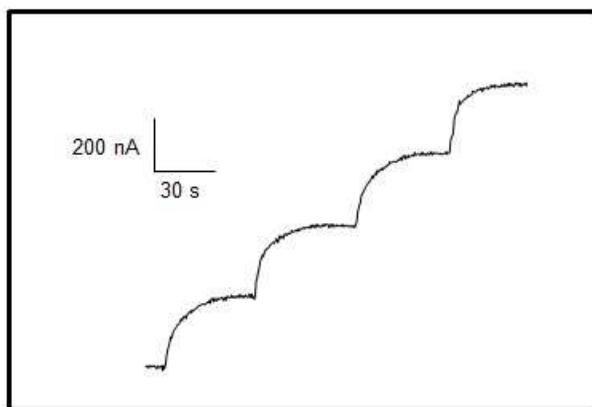


Figura 60. Señales amperométricas para colesterol 0.1 mM sobre el biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 8.0; $E_{ap} = 0.6$ V.

Caracterización

El biosensor desarrollado se caracterizó por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), empleando una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M para la obtención de los espectros de impedancia. En la *Figura 61* se comparan los gráficos de Nyquist correspondientes al biosensor ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE con los del electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y el electrodo sin modificar (GCE).

Como puede observarse, el electrodo AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE presenta un comportamiento de capacitador cuasi-ideal, debido a la elevada conductividad del material modificador, muy superior a la del electrodo de carbono vitrificado sin modificar. Los valores de la resistencia a la transferencia de carga, calculados a partir de las curvas, fueron, respectivamente, $R_{ct} = 2 \pm 2 \Omega$ y $R_{ct} = 745 \pm 48 \Omega$. Por otro lado, en la curva correspondiente al biosensor se hace patente un pequeño semicírculo, debido a la mayor dificultad para la reacción electródica al incorporar la enzima a la superficie del electrodo. El valor calculado para la resistencia a la transferencia de carga en este caso fue $R_{ct} = 43 \pm 8 \Omega$. Estos resultados demuestran que el método utilizado para la preparación del biosensor hace posible una eficiente inmovilización de la enzima sobre la superficie del electrodo.

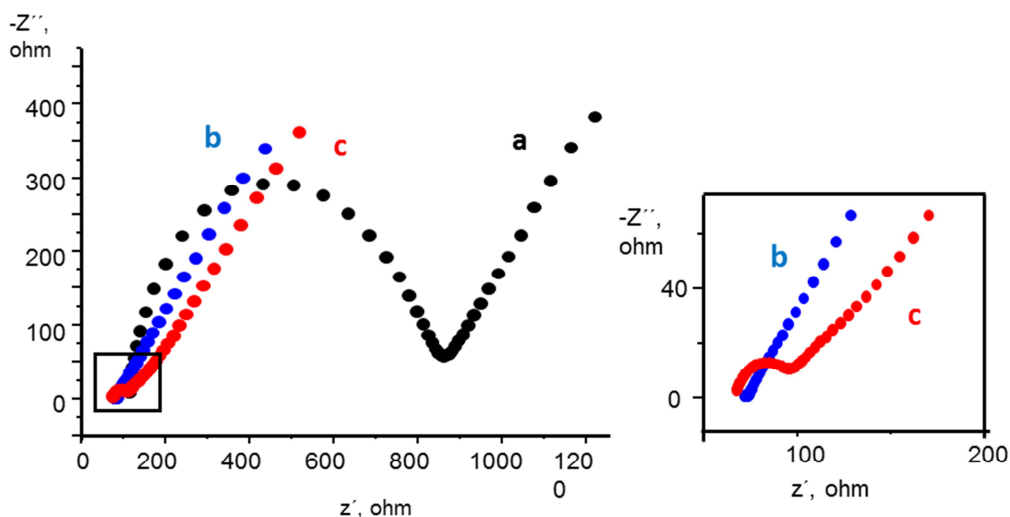


Figura 61. Diagramas de Nyquist para una disolución de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 5 mM y KCl 0.1 M sobre: GCE (a); AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (b); ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (c).

1.2.4. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

En los apartados que siguen se investiga la posibilidad de utilizar la superficie electródica desarrollada, AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, para preparar biosensores bienzimáticos empleando peroxidasa (HRP) y colesterol oxidasa (ChOx). Con esta nueva configuración se pretende mejorar las características analíticas del método desarrollado anteriormente para la determinación de colesterol, particularmente su selectividad.

Para la preparación del biosensor bienzimático, se añaden en la última etapa (ver *Figura 55*) las dos enzimas. La secuencia de reacciones implicadas en la detección se ha representado en la *Figura 62*. Como puede observarse, la enzima ChOx cataliza la oxidación del colesterol formando peróxido de hidrógeno cuya reducción es catalizada por la peroxidasa. En presencia de un mediador redox como la hidroquinona (HQ), esta reacción conduce a la aparición de la forma oxidada del mediador (quinona) cuya reducción electroquímica se utiliza para monitorizar el proceso global.

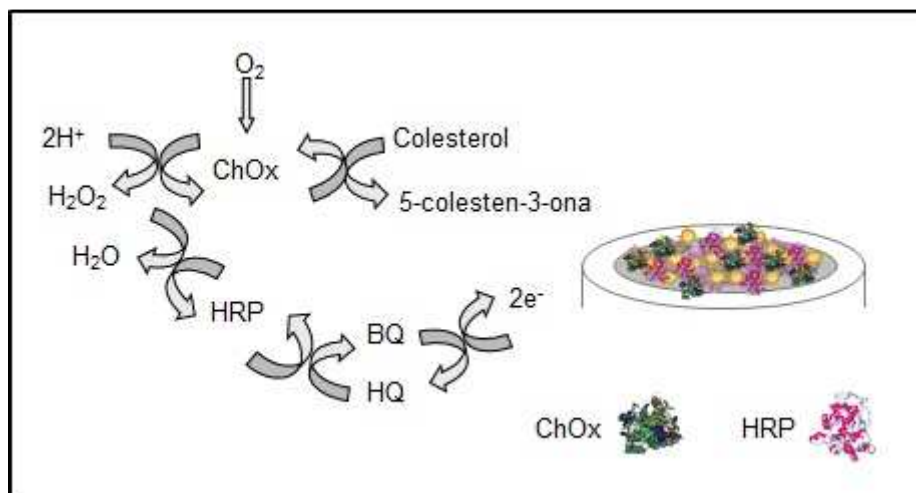


Figura 62. Esquema del funcionamiento del biosensor
ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

1.2.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

El factor limitante más común en la fabricación de biosensores electroquímicos es la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo, debido a que éste suele estar inmerso en la estructura aislante de la proteína. En enzimas que son de gran tamaño, como es el caso de la peroxidasa de rábano (HRP), la distancia que separa su centro redox de la superficie del electrodo es elevada, por lo que generalmente no se observa transferencia electrónica directa (DET) [Darder, 2000]. Cuando es difícil establecer dicha transferencia, se emplea un mediador redox, que es el encargado de transportar los electrones desde los centros activos de la enzima a la superficie del electrodo. En la Figura 63 se muestra un esquema de las dos reacciones catalíticas acopladas que tienen lugar al emplear un mediador redox y la enzima HRP; la primera está asociada a la regeneración de la actividad enzimática y la segunda a la regeneración electroquímica del mediador. El proceso global supone la transformación del sustrato (peróxido de hidrógeno) en el producto correspondiente (agua), mientras que la forma reducida del mediador pasa a la forma oxidada. El catalizador de este proceso, la peroxidasa, vuelve a su estado inicial al final de esta transformación. Para la regeneración de la peroxidasa pueden utilizarse mediadores redox que intercambien tanto uno como dos electrones.

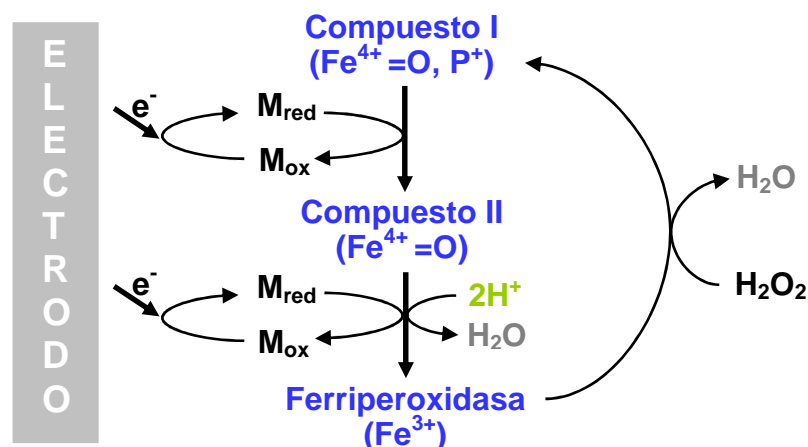


Figura 63. Esquema de las reacciones catalíticas acopladas de la peroxidasa en presencia de un mediador redox.

En primer lugar, se evaluó la idoneidad de diferentes mediadores redox (ferrocianuro, catecol e hidroquinona) realizando medidas amperométricas en el intervalo de potenciales de +0.2 a -0.2 V, empleando un biosensor modelo de HRP en ausencia de la enzima ChOx. En la *Figura 64* se muestran las curvas de variación de la corriente en función del potencial obtenidas para disoluciones que contienen H_2O_2 0.1 mM y los distintos mediadores en concentración 0.5 mM registrados con el biosensor HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

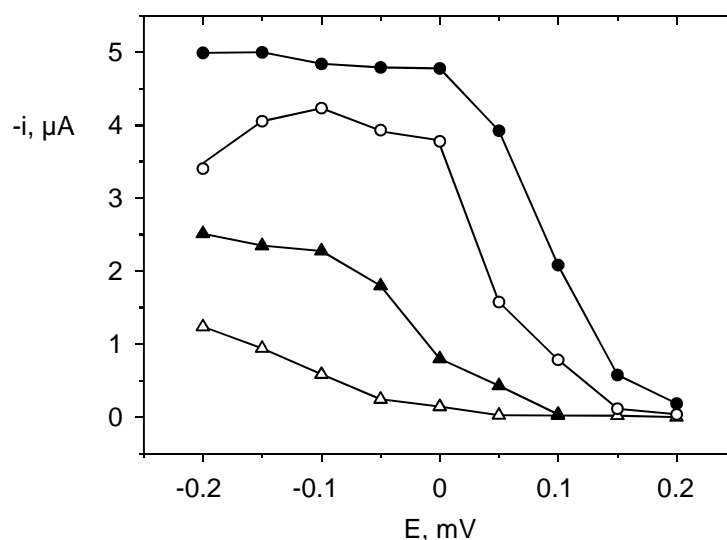


Figura 64. Respuesta amperométrica de H_2O_2 0.1 mM sobre el biosensor HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE en ausencia (Δ) y en presencia de mediador 0.5 mM: hidroquinona (\bullet), catecol (\circ) y ferrocianuro (\blacktriangle). Medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.5.

Como puede observarse, la mayor sensibilidad se obtiene para potenciales más negativos que 0.0 V, empleando hidroquinona como mediador. Con el fin de obtener una buena sensibilidad y selectividad, evitando la posible interferencia de compuestos como los ácidos ascórbico y úrico, finalmente se seleccionó hidroquinona como mediador y un potencial de detección de -0.05 V. Asimismo, como se verá más adelante, el pH óptimo para la detección del colesterol a través de este mediador resultó ser de 7.5.

Coinmovilización de las enzimas ChOx y HRP

Una vez optimizadas las variables que afectan a la detección de H_2O_2 , se estudió la coinmovilización de las enzimas ChOx y HRP sobre el electrodo modificado. Se optimizó la cantidad de enzima peroxidasa inmovilizada en la superficie del electrodo, midiendo la respuesta de varios biosensores preparados con una cantidad constante de colesterol oxidasa (1 U) y cantidades diferentes de HRP. En la *Figura 65* se han representado los resultados obtenidos, observándose cómo la máxima corriente en estado estacionario se alcanza cuando se emplean 4.7 U de HRP, disminuyendo para valores superiores probablemente debido a una menor inmovilización de la enzima ChOx. Esta cantidad de enzima se eligió para estudios posteriores.

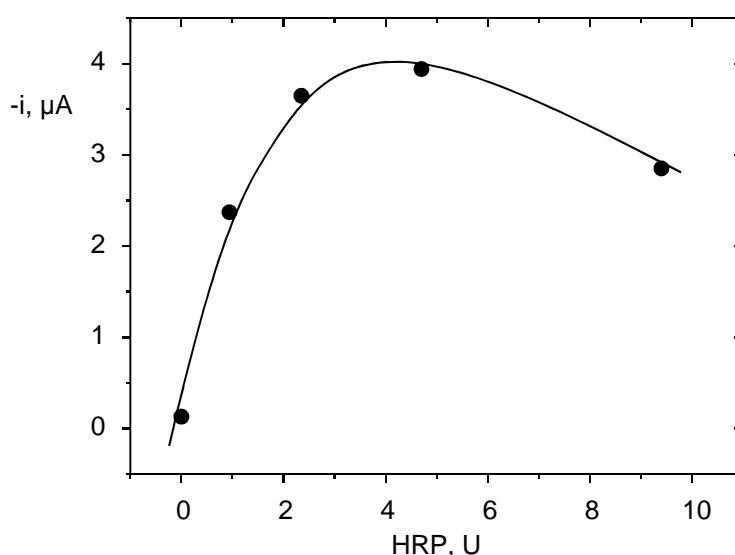


Figura 65. Influencia de la cantidad de enzima peroxidasa sobre la respuesta del biosensor ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.2 mM e HQ 0.5 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 7.5; $E_{ap} = -0.05$ V.

Hay que señalar que en este tipo de configuraciones bienzimáticas, debe mantenerse en exceso la cantidad de peroxidasa con respecto a la de la enzima oxidasa, ya que de este modo se asegura que todo el peróxido de hidrógeno producido en la primera reacción es reducido en presencia de peroxidasa, sin que llegue a formarse una concentración excesiva que envenenaría a la enzima HRP.

1.2.5. CALIBRADOS Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

En las *Figura 66* se han representado los calibrados para la determinación de colesterol obtenidos con los biosensores ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, respectivamente. Las características analíticas de los dos métodos se han resumido en la *Tabla 10*, donde se comparan con las de otros biosensores de colesterol oxidasa basados en electrodos modificados con nanotubos de carbono. Como puede observarse, los calibrados obtenidos con ambas configuraciones abarcan intervalos lineales muy parecidos y, según se demostrará más adelante, son apropiados para la determinación de colesterol en suero efectuando una simple dilución de la muestra. Los límites de detección se calcularon con el criterio $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado correspondiente y s_b es la desviación estándar ($n=10$) de las señales amperométricas de diferentes disoluciones de colesterol al nivel de concentración más bajo del intervalo estudiado. Los valores obtenidos son del mismo orden de magnitud, aunque algo inferior el del biosensor bienzimático, y menores que los encontrados para algunos biosensores descritos en la bibliografía [*Tsai, 2008; Manjunatha, 2011*]. En cuanto a las pendientes de los calibrados, la obtenida para el biosensor bienzimático es más de ocho veces superior a la del preparado en ausencia de peroxidasa. Como se observa en la *Tabla*, la sensibilidad de esta configuración se encuentra entre las más elevadas de las descritas en la bibliografía.

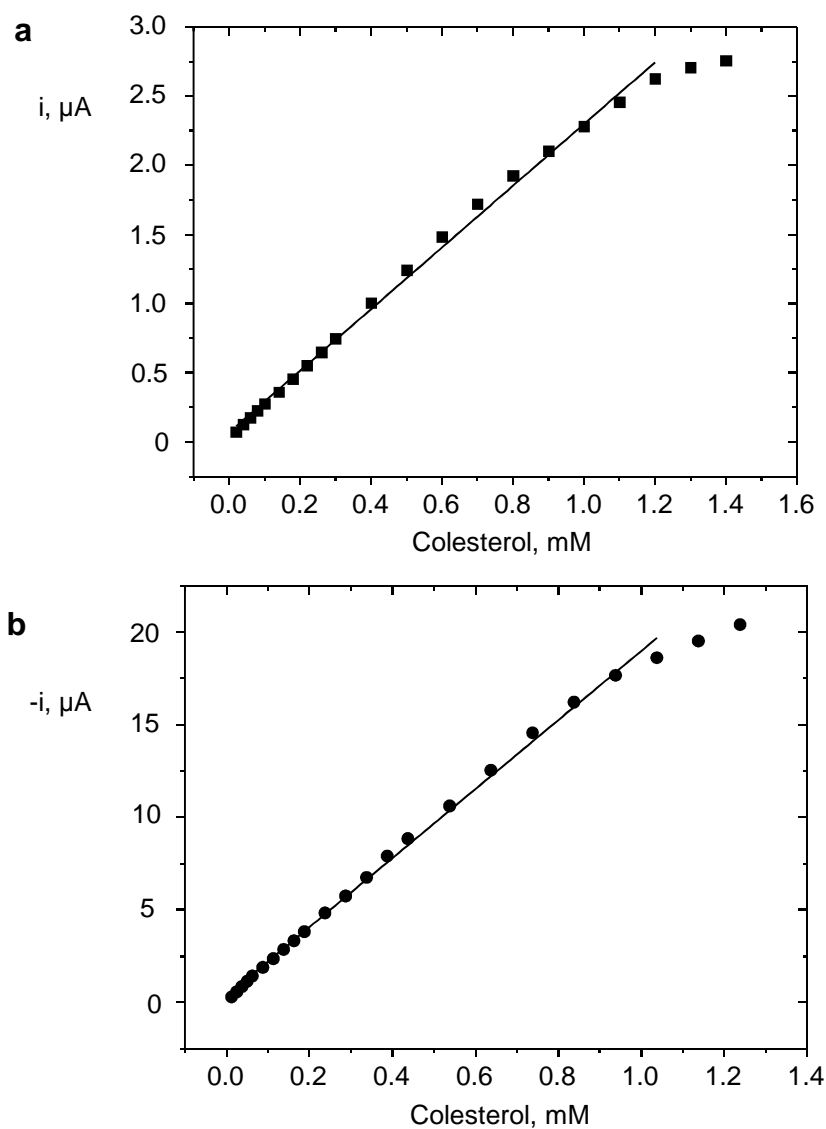


Figura 66. Calibrados para la determinación de colesterol con los biosensores:
a) $\text{ChOx}/\text{AuNPs}/\text{PDDA}/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$ y b) $\text{ChOx}/\text{HRP}/\text{AuNPs}/\text{PDDA}/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$.

Tabla 10. Características analíticas de los métodos para la determinación de colesterol empleando biosensores basados en electrodos modificados con colesterol oxidasa y nanotubos de carbono.

Electrodo	Potencial de detección, V	Int. lineal, mM	Pendiente, $\mu\text{A}/\text{mM}$	LOD, μM	RSD*, %	K_M^{app} , mM	Estabilidad** de almacenamiento ¹ u operacional ²	Tiempo de respuesta, s	Muestra	Referencia
PPD(PDDA/ChOx) _n /MWCNTs/AuE	0.7 vs Ag/AgCl	1 - 6	0.175	0.2	-	7.17	-	30	-	[Guo, 2004]
ChOx/MWCNTs/SiO ₂ /Chit/PB/GCE	-0.05 vs Ag/AgCl	0.004 - 0.7	1.55	1.0 (S/N=3)	4.2 (n=8)	0.24	50 días ² (89%)	13	suero	[Tan, 2005]
ChOx(PtNPs/CNTs/Chit/PSS) ₇ /MPS/AuE	0.4 vs SCE	0.005 - 5	-	3 (S/N=3)	-	-	1 semana ¹ (90%)	<20	suero	[Yang, 2006] _a
ChOx/Chit/NiNP/MWCNT/GCE	-0.2 vs SCE	0.005 - 3	-	1 (S/N=3)	5.8 (n=10)	-	1 mes ¹ (85%)	<15	suero	[Yang, 2006] _b
ChOx/PANI/CNTs/ITO	0.28 vs Ag/AgCl	1.29 - 12.93	6.8	-	-	-	12 semanas ¹ (95%)	10	-	[Dhand, 2008]
ChOx/PtNPs/Chit/MWCNTs/GCE	0.4 vs Ag/AgCl	-	3.1	4.79	-	-	7 días ² (60%)	-	-	[Tsai, 2008]
ChOx/Chit-IL/AuNPs/(SH)-MWCNT/ITO	-0.05 vs Ag/AgCl	0.5 - 5	0.2	-	1.9 (n=12)	-	20 días ¹ (95%)	7	suero	[Gopalan, 2009]
(ChOx/MWCNTs) ₅ /PDDA/grafito	-0.4 vs SCE	0.2 - 1	136.5	30	4.2 (n=10)	-	1 semana ¹ (92%)	-	-	[Manjunatha, 2011]
ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	0.6 vs Ag/AgCl	0.02 - 1.2	2.23 ± 0.06	4.4 (3s _b /m)	2.8 (n=5)	0.89	7 días ² (88%)	30-35	suero	<i>Este trabajo</i>
ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	-0.05 vs Ag/AgCl	0.01-1.05	18.6 ± 0.4	2.2 (3s _b /m)	5.1 (n=5)	2.18	8 días ² (78%)	15-20	suero	<i>Este trabajo</i>

Abreviaturas utilizadas: (SH)-MWCNTs: nanotubos de carbono tiolados de pared múltiple; AuE: electrodo de oro; AuNPs: nanopartículas de oro; Chit: quitosán; ChOx: colesterol oxidasa; GCE: electrodo de carbono vitrificado; IL: líquido iónico; ITO: óxido de indio y estaño; LOD: límite de detección; MPS: ácido 3-mercaptopropionosulfónico; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple; NiNP: nanopartículas de hexacianoferrato de níquel; PANI: poli(anilina); PB: azul de prusia; PDDA: poli-(cloruro de dialildimetilamonio); PSS: poli (4-estireno sulfonato); PtNPs: nanopartículas de platino; RSD: desviación estándar relativa; K_M^{app} : constante de Michaelis-Menten. *repetibilidad con un biosensor; ** porcentaje de la corriente inicial.

Parámetros cinéticos

La reacción enzimática de la colesterol oxidasa sobre los biosensores desarrollados ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE obedece el comportamiento cinético de Michaelis-Menten, como se deduce de los valores prácticamente iguales a la unidad ($\alpha=0.97$ y $\alpha=0.98$, respectivamente) de la pendiente de sus respectivas representaciones lineales de Hill ($\log [(I_{max}/I)-1]$ vs. $\log [\text{colesterol}]$). La constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{ap}) y la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) se calcularon para ambas configuraciones a partir de la representación de Lineweaver-Burk ($1/I$ vs. $1/[\text{colesterol}]$), obteniéndose respectivamente valores de 0.89 mM y 3.0 μA para el biosensor monoenzimático y de 2.18 mM y 50.6 μA para el biosensor bienzimático. En ambas configuraciones, la K_M^{ap} obtenida es menor que la de otras configuraciones, como la calculada para un biosensor basado en la inmovilización de la enzima ChOx en polipirrol (9.8 mM) [Singh, 2004] o en polianilina (6 mM) [Wang, 1999]. Estos resultados ponen de manifiesto la elevada afinidad de la enzima colesterol oxidasa por el sustrato en el microambiente creado por las nanopartículas de oro, cuando se emplean estas configuraciones.

1.2.6. ESTABILIDAD

Con objeto de evaluar la estabilidad de los biosensores desarrollados, se investigaron diferentes aspectos relacionados. En primer lugar se estudió la repetibilidad de las medidas realizadas con un mismo biosensor para cinco disoluciones de colesterol 0.1 mM, encontrándose valores de RSD del 2.8% y el 5.1% para los biosensores mono- y bienzimático, respectivamente. Además, se estudió la reproducibilidad de las medidas de cinco disoluciones de colesterol 0.5 mM realizadas con cinco biosensores diferentes preparados al mismo tiempo y de la misma manera. En este caso, los valores de RSD fueron del 4.8 % y del 7.6 %, respectivamente, para las configuraciones ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Estos resultados demuestran la buena precisión de las medidas realizadas con ambos biosensores, así como la reproducibilidad del proceso de fabricación.

Finalmente se evaluó el tiempo de vida de los biosensores desarrollados, realizando cada día tres medidas de una disolución de colesterol 0.05 mM, y almacenándolos a 4 °C en PBS de pH 7.4 después de cada uso. Los gráficos de control obtenidos en este estudio se han representado en la *Figura 67*. Los límites de control superior e inferior fueron calculados como $\pm 3s$ de los valores obtenidos para el primer día de medida (n=5).

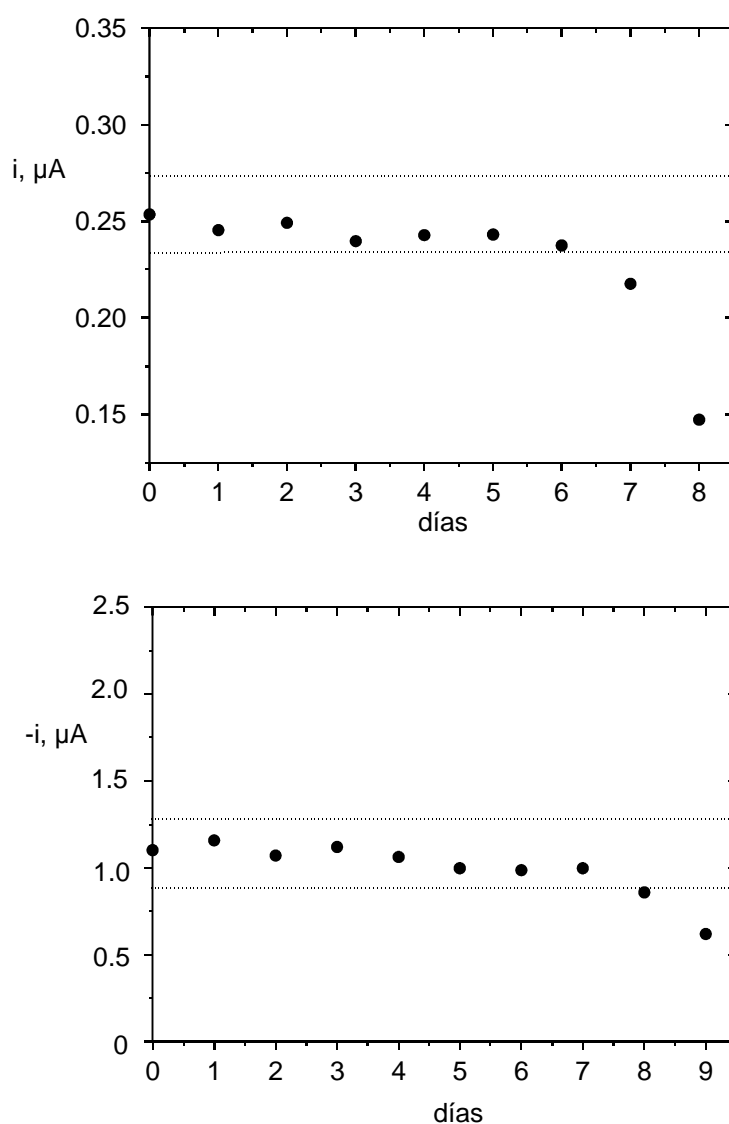


Figura 67. Diagramas de control contruídos para los biosensores ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (*superior*) y ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (*inferior*). Cada punto representa la media de la medida por triplicado de una disolución de colesterol 0.1 mM (*monoenzimático*) y 0.05 mM (*bienzimático*).

Como puede observarse, ambos biosensores muestran un tiempo de vida parecido, aunque ligeramente superior para el biosensor bienzimático. La respuesta permanece dentro de los límites de control (± 3 x desviación estándar de las medidas realizadas el primer día) durante 7-8 días para este biosensor y 6 días en el caso del biosensor monoenzimático, sin necesidad de aplicar ningún tratamiento de regeneración de la superficie biosensora. El biosensor preparado en ausencia de peroxidasa mantiene un 88 % de la respuesta inicial en el séptimo día de uso y un 53% en el octavo día. Por su parte, el biosensor bienzimático exhibe un 78% y un 58% de la respuesta inicial en el octavo y noveno día de uso, respectivamente. Los tiempos de vida encontrados se consideran aceptables, aunque no se han podido comparar con los proporcionados en la literatura (ver *Tabla 10*), en la que se reportan únicamente datos de estabildades de almacenamiento sin medidas a diario.

1.2.7. INTERFERENCIAS

Se estudió el efecto que sobre la señal de oxidación del colesterol produce la presencia de varias especies que pudieran coexistir con el analito en las muestras. En la *Figura 5* del artículo (pág. 176 del mismo) se han representado las respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor Nf/ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE medidas para disoluciones de ácido ascórbico, ácido úrico, glucosa y ácido láctico, preparadas a los niveles de concentración normales encontrados en suero humano, así como conteniendo una concentración de colesterol 0.5 mM, que es aproximadamente 10 veces menor que la correspondiente a los niveles normales de colesterol en suero.

Como se puede observar, en las condiciones empleadas únicamente los ácidos ascórbico y úrico presentan señales amperométricas significativas a pesar de la presencia de Nafion sobre la superficie del biosensor. Con el fin de conocer los niveles de concentración a los que estas sustancias comienzan a interferir en la determinación de colesterol, en la *Figura 68* se muestran las corrientes amperométricas obtenidas para mezclas de colesterol:interferente que contienen colesterol 0.5 mM y distintas concentraciones de los posibles interferentes. Como puede observarse, ambos compuestos comienzan a interferir significativamente para una concentración 0.01 mM, valor al que el incremento de señal que supone la presencia del interferente es

del 13.3% para el ácido ascórbico, y del 11.9% para el ácido úrico. Sin embargo, teniendo en cuenta los niveles normales de concentración en el suero de estos ácidos: 0.02 mM y 0.1 mM, respectivamente, y que la determinación de colesterol implica una dilución de la muestra de 50 veces, las interferencias de ambos compuestos se pueden considerar despreciables.

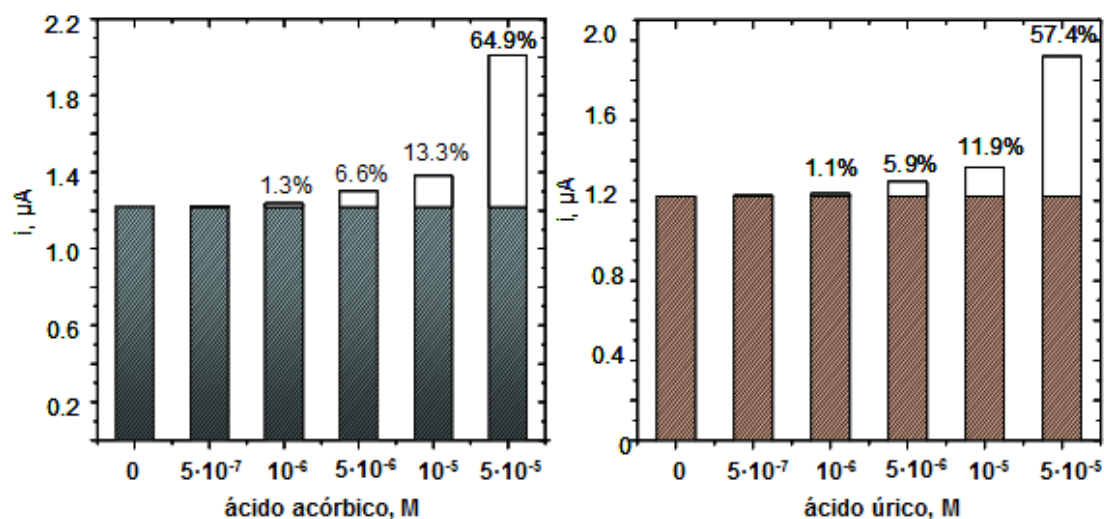


Figura 68. Señales amperométricas de mezclas colesterol:interferente para colesterol 0.5 mM y diferentes concentraciones de interferente medidas a + 600 mV con el biosensor Nf/ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 8.0.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio de interferencias realizado con el biosensor bienzimático ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE demostraron que el ácido ascórbico y el ácido úrico no interfieren significativamente en la determinación de colesterol (<1% con respecto a la señal de colesterol en ambos casos). Este comportamiento se debe a que al potencial de detección empleado para las medidas, -0.05 V, se evita la interferencia de ambos ácidos, como se observa en la Figura 6 del artículo (pág. 176 del mismo).

1.2.8. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO

La utilidad de los biosensores desarrollados para la determinación de colesterol en muestras reales se demostró analizando suero humano al que se adicionó colesterol a tres niveles de concentración: 2, 5 y 7 mM. Estos valores corresponden a los niveles normales de colesterol en este tipo de muestras, ya que la concentración normal de colesterol total en suero es < 200 mg/dl (~ 5.2 mM), considerándose elevado por encima de 240 mg/dl (~ 6.2 mM). Siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 1.1.4.1.*, una alícuota de 100 μ L de la muestra de suero enriquecido se adicionó a la célula de medida, conteniendo 5 mL de PBS 0.1 M, y se aplicó el método de adiciones estándar por adiciones sucesivas de colesterol 0.1 mM.

La existencia de efecto matriz se evaluó comparando las pendientes obtenidas realizando calibrados externos con ambos biosensores (*Tabla 10*), con las pendientes de los calibrados obtenidos mediante adiciones estándar, (2.19 ± 0.06) μ A mM^{-1} y (19.1 ± 0.5) μ A mM^{-1} , para los biosensores mono- y bienzimático, respectivamente. Aplicando el método test de la *t* de Student para un nivel de significación de 0.05 se observó que no existían diferencias significativas entre las pendientes y, por lo tanto, la ausencia de efecto matriz en este tipo de muestras.

En la *Tabla 11* se muestran los valores de concentración de colesterol encontrados en las muestras de suero enriquecido, calculados como la media de cinco determinaciones, empleando los biosensores mono y bienzimático desarrollados. Los intervalos de confianza se calcularon para un valor de significación de 0.05 , obteniéndose en todos los casos valores de RSD inferiores al 10% .

Tabla 11. Determinación de colesterol en muestras de suero humano enriquecido.

ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

Muestra	Colesterol encontrado (mM)	RSD (%)	Colesterol adicionado (mM)	Recuperación (%)
1	1.97 ± 0.05	2.9	2.0	98 ± 3
2	5.02 ± 0.08	1.8	5.0	100 ± 2
3	7.1 ± 0.1	1.6	7.0	102 ± 2

Factor de dilución=50

ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE

Muestra	Colesterol encontrado (mM)	RSD (%)	Colesterol adicionado (mM)	Recuperación (%)
1	2.1 ± 0.1	5.0	2.0	104 ± 5
2	4.9 ± 0.2	3.6	5.0	98 ± 3
3	7.3 ± 0.2	3.1	7.0	104 ± 4

Factor de dilución=50

La validación de los resultados obtenidos para la determinación de colesterol se ha realizado empleando el ensayo de hipótesis utilizando el método test de la *t* de Student. Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias significativas entre la concentración de colesterol adicionada y la recuperada a un nivel de significación de 0.05. Además, en la Tabla pueden apreciarse recuperaciones comprendidas entre (98 ± 3) % y (102 ± 2) % para el biosensor monoenzimático, y entre (98 ± 3) % y (104 ± 5) % para el biosensor bienzimático. Estos resultados demuestran el buen comportamiento de ambos biosensores para la determinación de colesterol libre en muestras de suero sin necesidad de aplicar ningún tratamiento de la muestra salvo una dilución apropiada.

BIOSENSOR BIENZIMÁTICO DE COLESTEROL BASADO EN UN ELECTRODO HÍBRIDO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLI(DIALILDIMETILAMONIO) CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

2

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) han ido ganando importancia en estos últimos años como sustratos adecuados para la inmovilización de proteínas, enzimas y otras biomoléculas en distintas aplicaciones analíticas, médicas y biotecnológicas [Gupta, 2005; Sathe, 2006; Lu, 2007_a]. Esto es debido, por un lado, a su biocompatibilidad y, por otro, a su elevada área superficial que les confiere una gran capacidad para la inmovilización de biomoléculas. Además, las nanopartículas magnéticas poseen la capacidad de sedimentar como respuesta a la aplicación de un campo magnético para, en ausencia de dicho campo, volver a redispersarse mediante agitación, lo que facilita las etapas de preparación de biosensores. Otras ventajas, en comparación con otras nanopartículas metálicas, son su fácil preparación y su baja toxicidad [Li, 2010]. Estas propiedades hacen de estos nanomateriales, productos muy adecuados para la preparación de biosensores.

La coprecipitación de Fe^{3+} y Fe^{2+} en disolución alcalina es el método más utilizado para la síntesis de nanopartículas de magnetita ($n\text{Fe}_3\text{O}_4$) [Hong, 2007]. Una vez obtenido, este material tiene tendencia a formar aglomerados debido a la interacción dipolar que ocurre entre las nanopartículas, lo cual las hace poco estables en suspensión. Debido a esto, para su aplicación en la preparación de biosensores, generalmente se lleva a cabo una modificación superficial con el fin de debilitar esta

interacción, de modo que se favorezca su solubilidad, y además se incluyan grupos funcionales específicos que permitirán la inmovilización estable de enzimas.

Como ya se comentó en la Introducción, en la actualidad existen relativamente pocos biosensores enzimáticos basados en electrodos modificados con nanopartículas magnéticas. Cabe citar, como ejemplo, un biosensor de tirosinasa preparado a partir de nanotubos de carbono recubiertos de nanopartículas de Fe_3O_4 aplicado a la detección de coliformes usando un sistema de inyección en flujo. En este diseño, la superficie del electrodo se preparó dispersando nanotubos de carbono modificados con poliestireno sulfonato sódico (PSS) en PDDA, a los que posteriormente se incorporaban las nanopartículas magnéticas [Cheng, 2009]. Además se ha preparado otra configuración por coprecipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} en disolución alcalina en presencia de nanotubos de carbono y quitosan. Posteriormente, la mezcla se dispersaba en glucosa oxidasa entrecruzando con glutaraldehído para preparar un biosensor de glucosa [Qu, 2007]. También se ha preparado un biosensor de glucosa por inmovilización covalente de glucosa oxidasa sobre nanopartículas magnéticas aminofuncionalizadas y su posterior inclusión junto con azul de prusia en un electrodo de pasta de carbono [Li, 2009].

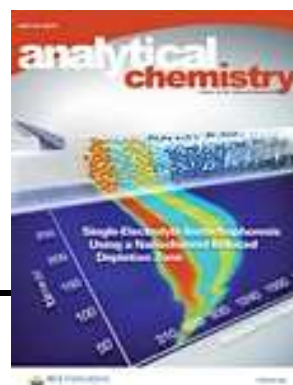
En este trabajo se preparó una superficie electródica basada en un material híbrido de nanotubos de carbono, PDDA, y nanopartículas magnéticas. Una vez sintetizadas, las nanopartículas de Fe_3O_4 fueron funcionalizadas en primer lugar con (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) y posteriormente con glutaraldehído (GA) con el fin de llevar a cabo la inmovilización estable de la enzima. La superficie electródica desarrollada GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE se empleó para la preparación de un biosensor de colesterol basado en las enzimas colesterol oxidasa y peroxidasa.

A continuación se muestra la publicación a que dio lugar este trabajo, comentándose posteriormente los resultados que se han considerado más relevantes, así como aquellos estudios que no se incluyeron en el artículo o que aparecieron en la información complementaria del mismo.

Designing Electrochemical Interfaces with Functionalized Magnetic Nanoparticles and Wrapped Carbon Nanotubes as Platforms for the Construction of High-Performance Bienzyme Biosensors

Marcos Eguílaz, Reynaldo Villalonga, Paloma Yáñez-Sedeño,
José M. Pingarrón

Analytical Chemistry



Vol. 83, pp. 7807-7814, 2011

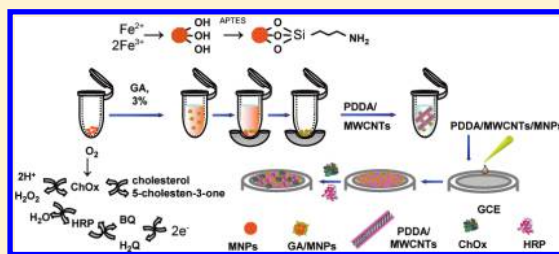
Designing Electrochemical Interfaces with Functionalized Magnetic Nanoparticles and Wrapped Carbon Nanotubes as Platforms for the Construction of High-Performance Bienzyme Biosensors

Marcos Eguílaz, Reynaldo Villalonga, Paloma Yáñez-Sedeño, and José M. Pingarrón*

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

Supporting Information

ABSTRACT: The design of a novel biosensing electrode surface, combining the advantages of magnetic ferrite nanoparticles (MNPs) functionalized with glutaraldehyde (GA) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA)-coated multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) as platforms for the construction of high-performance multienzyme biosensors, is reported in this work. Before the immobilization of enzymes, GA-MNP/PDDA/MWCNT composites were prepared by wrapping of carboxylated MWCNTs with positively charged PDDA and interaction with GA-functionalized MNPs. The nanoconjugates were



characterized by scanning electron microscopy (SEM) and electrochemistry. The electrode platform was used to construct a bienzyme biosensor for the determination of cholesterol, which implied coimmobilization of cholesterol oxidase (ChOx) and peroxidase (HRP) and the use of hydroquinone as redox mediator. Optimization of all variables involved in the preparation and analytical performance of the bienzyme electrode was accomplished. At an applied potential of -0.05 V, a linear calibration graph for cholesterol was obtained in the 0.01 – 0.95 mM concentration range. The detection limit (0.85 μ M), the apparent Michaelis–Menten constant (1.57 mM), the stability of the biosensor, and the calculated activation energy can be advantageously compared with the analytical characteristics of other CNT-based cholesterol biosensors reported in the literature. Analysis of human serum spiked with cholesterol at different concentration levels yielded recoveries between 100% and 103%

The search for electrode interfaces able to conjugate an efficient immobilization of biomolecules with a high electroanalytical performance in terms of sensitivity, rapidity of transducer response, and easy real applicability is a challenge in the field of advanced electrochemical biosensors. The use of nanostructured electrode surfaces with carbon nanotubes (CNTs) or metal nanoparticles for such a purpose is well documented in the recent literature.¹ However, electrode modification with magnetic nanoparticles (MNPs) for implementing efficient bioelectrodes is a much less explored area, although MNPs constitute a very interesting material for the construction of biosensing devices because of their high biocompatibility and protein load capacity.² The large surface area provided by MNPs for biomolecules attachment makes them extremely useful for purification and/or preconcentration purposes, which usually leads to enhanced detection sensitivity. Moreover, their magnetism makes the biosensors construction steps much easier by application of an external magnetic field (see below). Other advantages, in comparison with metal nanoparticles, are nontoxicity and ease of preparation. In particular, various applications to the preparation of electrochemical enzyme biosensors have been reported in the last years. For example, a sensitive tyrosinase biosensor based on magnetic Fe_3O_4 -coated CNTs was prepared and applied to the detection of coliforms by use of a flow injection system. In this design, the electrode surface for enzyme immobilization was

fabricated by dispersing polystyrene sulfonate (PSS)-wrapped multiwalled CNTs (MWCNTs) in poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) and further incorporation of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles by mixing with PDDA/MWCNT solution and ultrasonication for 1 h.³ Another reported configuration involved chemical coprecipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} in alkaline solution in the presence of CNTs and chitosan (Chit) to give CNTs/ Fe_3O_4 /Chit. Then, the composite was dispersed in glucose oxidase (GOx) solution and cross-linked with glutaraldehyde to prepare a glucose biosensor. The intense electrocatalytic activity toward hydrogen peroxide allowed the low-potential amperometric biosensing of glucose.⁴ Another glucose biosensor was also described that made use of MWCNTs decorated with silicon dioxide-coated magnetic nanoparticles on a glassy carbon electrode. The GOx biosensor was prepared by deposition of the enzyme over Nafion-solubilized $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MWCNT}$ electrode.⁵ Also, a novel glucose biosensor was prepared with Fe_3O_4 nanoparticles, Prussian Blue, and GOx attracted to the surface of solid paraffin carbon paste electrode by magnetic force. GOx was covalently conjugated to the amine-modified nanoparticles.⁶ Magnetic Fe_3O_4

Received: June 9, 2011

Accepted: September 10, 2011

Published: September 11, 2011

nanoparticles were used to prepare a disposable glucose biosensor by drop-coating of ferricyanide– Fe_3O_4 mixture onto the surface of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and layering on GOx.⁷ Another example is that based on simple mixing of GOx with Fe_3O_4 nanoparticles, cross-linking on a Pt electrode with Chit medium by glutaraldehyde, and coating with a thin Nafion film.⁸

Not only enzyme electrodes have been prepared with magnetic nanoparticles and CNTs. For instance, a highly sensitive electrochemical immunosensor was developed by immobilization of both tyrosinase and magnetic nanoparticles onto the surface of CNTs by covalent attachment, followed by additional cross-linking via glutaraldehyde to construct multilayered tyrosinase–magnetic nanoparticles aggregates. Then, a primary antibody against a target analyte of hIgG was immobilized and used for a sandwich-type immunoassay with a secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase.⁹

On the other hand, PDDA is a water-soluble, quaternary ammonium cationic polyelectrolyte with adhesion and film-forming properties; it is a positively charged colloid when dissolved in aqueous solutions.^{10–12} It has been used as a dispersant of CNTs since positively charged PDDA can easily coat the negatively charged surface of carboxylated CNTs, conferring water solubility and solution stability to PDDA-coated CNTs through electrostatic mechanism. The layer-by-layer (LBL) assembling approach using CNTs and PDDA has been used to prepare various enzyme biosensor configurations.^{13,14} The adhesion and film-forming properties of PDDA play an essential role in the construction of stable and useful biointerfaces.

The aim of this work is to design a novel biosensing electrode surface, combining the advantages of functionalized MNPs and PDDA-coated CNTs, suitable to construct multienzyme biosensors with enhanced analytical performance with respect to CNT-based designs. To our knowledge, this strategy is reported for the first time in this work. As the target analyte to evaluate the capabilities of this new electrochemical interface, we selected cholesterol due to the well-documented existing literature on cholesterol biosensors involving immobilization of the enzyme cholesterol oxidase (ChOx) on different electrode substrates.¹⁵ Nanocomposite films of polyaniline (PANI) and multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) on indium tin oxide (ITO)-coated glass plates with further covalent immobilization of ChOx were used to prepare an electrochemical cholesterol biosensor.¹⁶ Also, an ITO-coated glass electrode modified with gold nanoparticles (AuNPs) electrodeposited onto thiol functionalized MWCNTs was used to construct an amperometric biosensor in which ChOx was immobilized onto a cross-linked matrix of Chit and a room-temperature ionic liquid.¹⁷ MWCNTs dispersed in a Pt nanoparticle-doped Chit solution were utilized to form stable ultrathin multilayer films on gold electrodes where ChOx was immobilized by use of glutaric dialdehyde.¹⁸ Nickel hexacyanoferrate nanoparticles (NiNP) attached to MWCNTs through histidine have been also used to immobilize ChOx on a glassy carbon electrode (GCE).¹⁹ Pt nanoparticles electrochemically deposited onto a MWCNT/Chit matrix were also employed to prepare a ChOx biosensor.²⁰ Furthermore, a sol–gel Chit/ SiO_2 and MWCNT organic–inorganic hybrid composite was used for the immobilization of ChOx on the surface of a Prussian Blue-modified GCE.²¹ Finally, a MWCNT/sol–gel-derived SiO_2 /Chit nanobiocomposite, where cholesterol esterase (ChEt) and ChOx were coimmobilized with glutaraldehyde, was reported for determination of total cholesterol.²²

Moreover, the direct electrochemistry of ChOx was observed on the surface of a multilayer ChOx/MWCNT prepared onto a PDDA-modified graphite electrode.^{12,3} An amperometric cholesterol biosensor was fabricated through LBL deposition of PDPA and ChOx on MWNTs-modified gold electrode, followed by electrochemical generation of a nonconducting poly(*o*-phenylenediamine) (PPD) film as protective coating.²⁴

Therefore, according to the aim of this work, we developed a bienzyme biosensor by coimmobilization of ChOx and horseradish peroxidase (HRP) onto a MNP/PDDA/MWCNT-modified GCE. Magnetic ferrite nanoparticles were functionalized previously with glutaraldehyde to improve the immobilization of the enzymes onto the composite material. Moreover, the coimmobilization of HRP and the use of hydroquinone as a redox mediator allowed a low detection potential for H_2O_2 to be used, thus increasing the selectivity of the method and avoiding the accumulation of H_2O_2 , which causes ChOx inactivation.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Solutions. Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs, 30 ± 15 nm ϕ) with 95% purity were supplied from NanoLab, Brighton, MA. Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDPA) (20% w/w in water) was from Sigma–Aldrich. Cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp. (Sigma, 34 units/mg of solid) was used. Lyophilized powder (500 units) was dissolved in 1.0 mL of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and from this, aliquots were prepared and frozen at -50°C until use. Horseradish peroxidase (HRP) type II (Sigma, 188 units/mg of solid) was also employed. Solutions containing $1880 \text{ units} \cdot \text{mL}^{-1}$ were prepared in 0.1 M PBS, pH 7.4. Stock 0.02 M solutions of cholesterol were prepared by dissolving 0.0386 g of the product (Sigma, 99%) by gentle stirring in 0.2 mL of aqueous Triton X-100 (Merck) at 60°C and dilution with 0.1 M phosphate buffer solution of pH 7.5 up to a volume of 5.0 mL. More diluted cholesterol standard solutions were prepared from this by use of 0.1 M phosphate buffer solution of pH 7.5 containing 1% Triton X-100 (PBS). An 0.1 M PBS solution containing 1% Triton X-100 was also used as supporting electrolyte. Hydrogen peroxide (100 mM; Scharlau, 35%) and 100 mM hydroquinone (HQ) (Sigma) solutions were prepared daily by dilution in 0.1 M PBS, pH 7.5. Glutaraldehyde (GA, Aldrich, 25%) solutions were prepared by dilution in 0.1 M PBS of pH 7.5. (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) was acquired from Sigma–Aldrich. All chemicals were of analytical reagent grade, and the water used was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA). The analyzed samples were lyophilized human serum (Sigma) spiked with cholesterol.

Electrochemical Instrument and Electrodes. Amperometric and voltammetric measurements were carried out with a BAS 100 B potentiostat (West Lafayette, IN) provided with a BAS C2 EF-1080 cell stand and controlled by BAS 100 W 2.0 electrochemical analysis software. A three-electrode (BAS VC-2 5-mL) glass electrochemical cell was used. The electrochemical biosensor with a Metrohm 6.084.010 glassy carbon electrode (3 mm ϕ) as electrode substrate was used as the working electrode. The reference electrode was an Ag/AgCl/KCl 3 M BAS MF 2063, and a BAS MW 1032 Pt wire was used as the auxiliary electrode. Electrochemical impedance measurements were performed on a μ -Autolab type III with FRA2 software (Ecochemie).

Preparation of PDPA/MWCNTs. MWCNTs were chemically shortened and carboxylated by treatment with a 3:1 mixture of

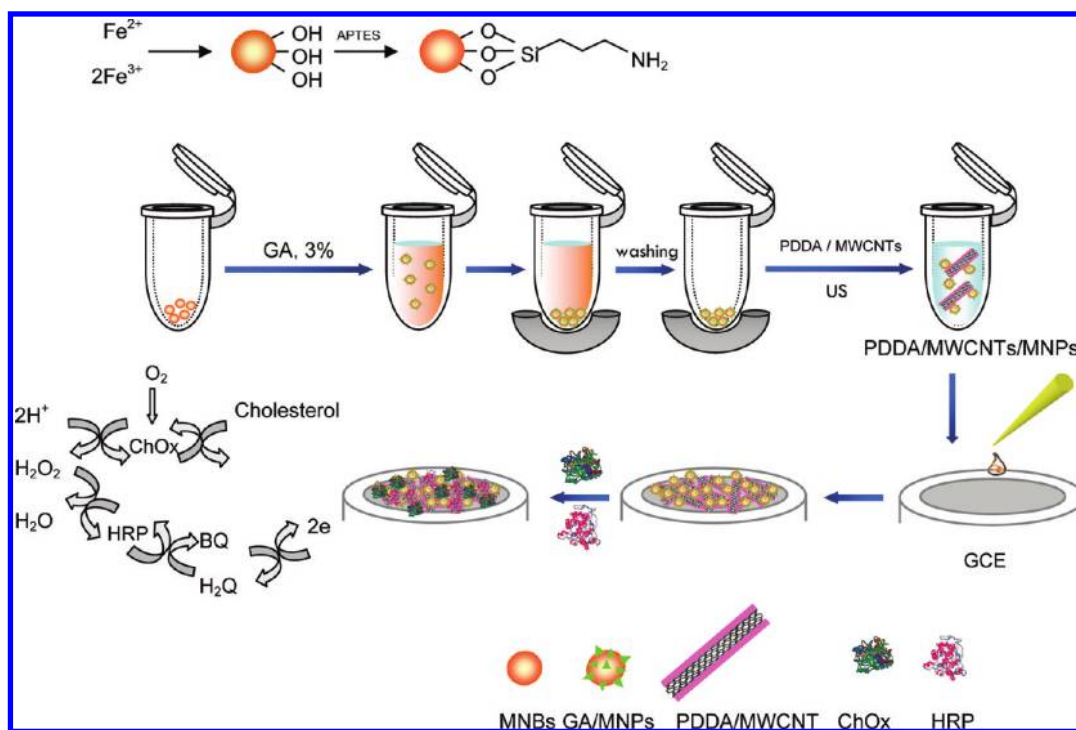


Figure 1. Steps involved in the construction and functioning of the HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor.

sulfuric and nitric acids under ultrasonic stirring for 5 h. The resulting product was centrifuged at 14 000 rpm and exhaustively washed with distilled water. Functionalization of MWCNTs with PDDA was carried out by dispersion of 10 mg of carboxylated MWCNTs in 20 mL of a 0.25% PDDA aqueous solution containing 0.5 M NaCl and sonicated for 30 min.²⁵ The resulting dispersion was centrifuged at 14 000 rpm and washed three times with water. Finally, 4 mg of dry PDDA/MWCNTs were dispersed in 5 mL of water and the resulting solution was sonicated for 5 min before use.

Preparation of Glutaraldehyde-Functionalized Fe_3O_4 /APTES Magnetic Nanoparticles. Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were prepared by following the method described in the literature²⁶ with little modification. Briefly, 5.4 g of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 2.0 g of $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in 25 mL of 0.5 M HCl under N_2 atmosphere. Then, drops of this solution were continuously added to 250 mL of a 1.5 M NaOH solution with vigorous mechanical stirring and ultrasound treatment under continuous N_2 bubbling. The black precipitate formed was isolated by magnetic decantation, exhaustively washed with double-distilled water until neutrality, and further washed twice with ethanol and dried under vacuum. Via this protocol, quasi-spherical magnetic nanoparticles with average size of 14 ± 7 nm were obtained, as revealed by transmission electron microscopy (TEM).²⁷ The core-shell Fe_3O_4 /APTES nanoparticles (MNPs) were prepared as previously reported²⁸ by dispersing 300 mg of the synthesized Fe_3O_4 nanoparticles in a mixture of 600 mL of ethanol and 4 mL of water by sonication. APTES (120 μL) was then added, and the mixture was mechanically stirred under N_2 atmosphere for 7 h. The nanoparticles were separated by magnetic decantation and purified by five cycles of redispersion in ethanol and magnetic decantation. MNPs were finally dried at room temperature under vacuum. The core-shell Fe_3O_4 /APTES nanoparticles showed similar shape to the uncoated material, with a slightly larger size, 17 ± 9 nm, due to the polysiloxane

coverage.²⁷ Glutaraldehyde-functionalized MNPs (GA-MNPs) were prepared by dispersing 1 mg of Fe_3O_4 /APTES nanoparticles in 1 mL of 3% glutaraldehyde solution in sodium phosphate buffer, pH 7.5. The mixture was mechanically stirred for 2 h, and the modified nanoparticles were magnetically decanted and sequentially washed four times with distilled water. The resulting solid was finally dried at room temperature.

Preparation of HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE Biosensor. First, the GCE surface was polished with 0.3 μm alumina slurries, rinsed thoroughly with deionized water, sonicated for 30 s in water and 30 s in acetone, and dried in air. Then, GA-MNP/PDDA/MWCNT conjugate was prepared by addition of 1 mg of GA-MNPs to 500 μL of the PDDA/MWCNT dispersion and sonicated for 5 min. Then 10 μL of GA-MNP/PDDA/MWCNT dispersion was cast on the GCE surface and dried at room temperature. Immobilization of HRP and ChOx was carried out by dropping a 5- μL aliquot of a 940 units/mL HRP and 200 units/mL ChOx solution prepared in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, onto the modified electrode surface, and the solvent was allowed to evaporate at room temperature.

Determination of Cholesterol in Spiked Human Serum. The solid serum was reconstituted in 1 mL of cholesterol solution (2.0, 5.0, or 7.0 mM) by mixing up to total dissolution. Serum was directly analyzed by dilution of 100- μL aliquots up to 5.0 mL with 0.1 M PBS, pH 7.5. The ChOx/HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor was immersed into the stirred solution and the steady-state current was measured at a constant potential of -0.05 V versus Ag/AgCl. Quantification of cholesterol was accomplished by applying the standard additions method involving the addition of 0.1 mM cholesterol aliquots.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 (not to scale) displays graphically the different steps involved in preparation of the biosensor. Before the immobilization

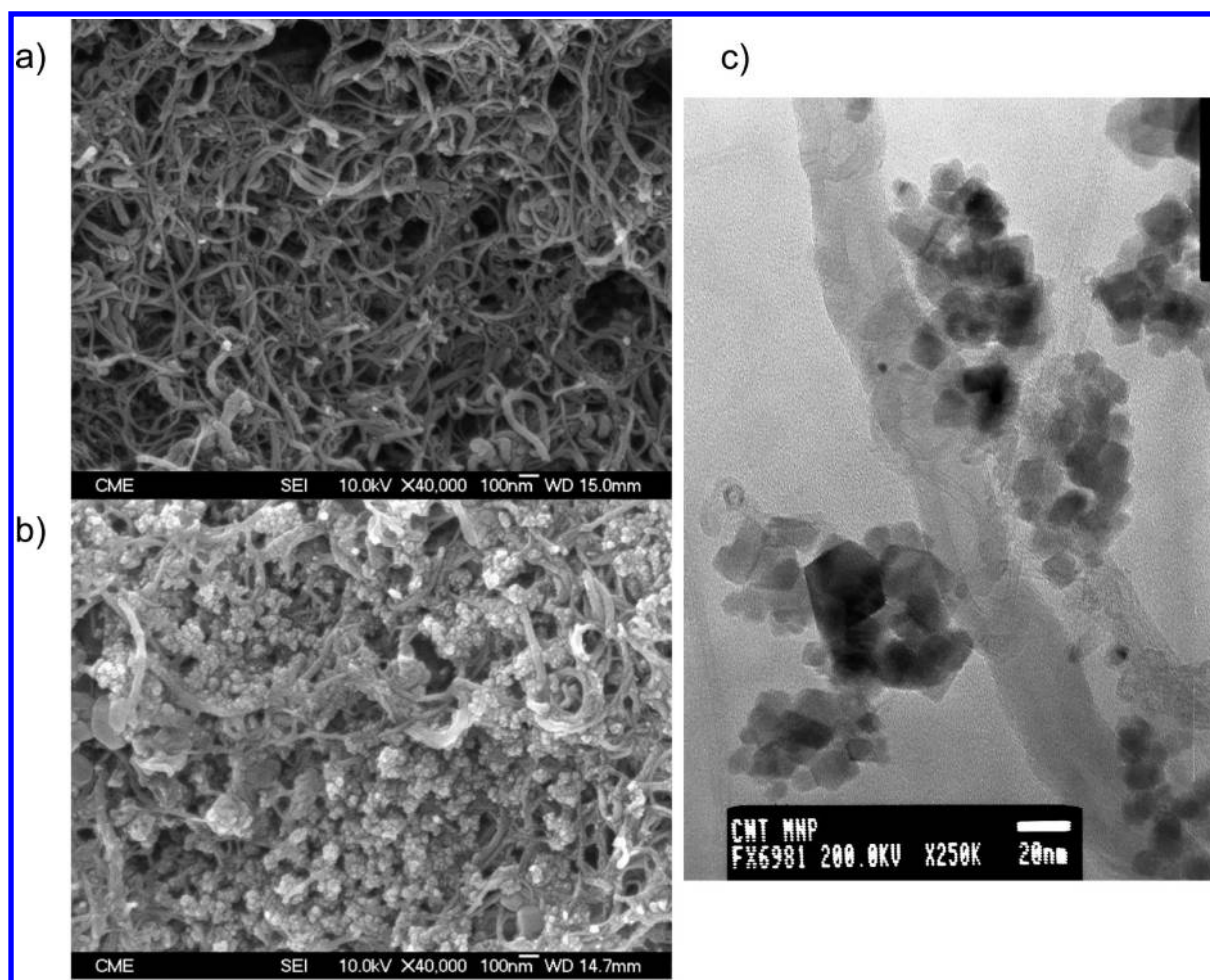


Figure 2. SEM images of (a) PDDA/MWCNTs and (b) GA-MNP/PDDA/MWCNTs. (c) TEM image of GA-MNP/PDDA/MWCNTs.

of enzymes, GA-MNP/PDDA/MWCNT composites were prepared. As described above, first MWCNTs were carboxylated by acid treatment. Then, PDDA/MWCNT conjugates were prepared by dispersing the carboxylated MWCNTs in an aqueous PDDA solution. Wrapping of MWCNT surface with positively charged PDDA occurred by electrostatic interaction.²⁵ Figure 2a shows a scanning electron microscopy (SEM) image of PDDA/MWCNTs.

Glutaraldehyde-functionalized Fe_3O_4 /APTES magnetic nanoparticles (GA-MNPs) were prepared as described in the Experimental Section. As depicted in Figure 1, once Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized, the aminosilane coupling agent APTES was incorporated as an active film to allow further functionalization by covalent binding. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of Fe_3O_4 /APTES nanoparticles (Figure S1, Supporting Information) showed two absorption bands at 590 and 639 cm^{-1} that are assigned to the split of the stretching vibration band of the Fe–O bonds in bulk magnetite at 570 cm^{-1} .²⁸ Also, a band at 448 cm^{-1} , corresponding to the hypsochromic shift of the ν_2 band of the Fe–O bond of bulk magnetite, was observed. Moreover, Si–OH and Si–O–Si bands of the silane film appeared overlapped at 1020 cm^{-1} . The presence of the Si–OH groups also gave broad bands at 3698 and 3200 cm^{-1} , which can be attributed to the free and hydrogen-bonded hydroxyl groups linked to Si atoms. Finally, the presence of amino groups in the Fe_3O_4 /APTES nanoparticles was evident by the band appearing at 1628 cm^{-1} ,

characteristic of NH_2 stretching. The magnetic properties of Fe_3O_4 and Fe_3O_4 /APTES nanoparticles were also studied at room temperature by use of a vibration sample magnetometer (VSM). For both materials, the results obtained showed magnetization curves (Figure S2, Supporting Information) characteristic of superparamagnetic behavior. This implies that magnetic particles redispersed in solution without the occurrence of severe aggregation that ferromagnetic nanoparticles suffer.²⁸ The saturation magnetization of Fe_3O_4 was 60 emu/g, being slightly lower (57.3 emu/g) for Fe_3O_4 /APTES as a consequence of the APTES coating layer. Magnetic nanoparticles were subsequently functionalized with glutaraldehyde (GA) in order to improve immobilization of the enzymes on the composite materials.

In a further step, GA-MNP/PDDA/MWCNT conjugates were prepared by interaction of the MNPs with PDDA-wrapped MWCNTs. Although the exact nature of this interaction is not completely clear, we think that the ability of PDDA to permit adhesion as well its demonstrated film-forming capability allow MNPs to be included into the film coating MWCNTs. The inherent porosity of the silane matrix coating MNPs should favor this film inclusion process. Figure 2 shows (b) SEM and (c) TEM images of these conjugates, where it can be clearly observed that MNPs are attached to the wrapped-MWCNT surface. The conjugates were cast on the GCE surface and dried at room temperature. The modified electrode was characterized by cyclic voltammetry in 0.1 M KCl solution containing 5 mM

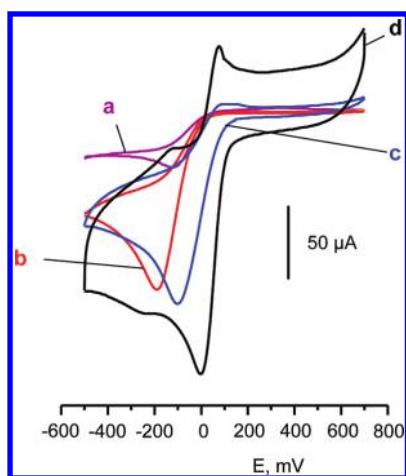


Figure 3. Cyclic voltammograms from solutions containing 1 mM hydroquinone and 2 mM H_2O_2 , recorded at (a) HRP/GA/GCE, (b) HRP/GA-MNP/GCE, (c) HRP/GA/PDDA/MWCNT/GCE, and (d) HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE; $v = 50 \text{ mV/s}$.

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ as redox probe at different potential scan rates. The well-defined oxidation and reduction peaks (Figure S3, Supporting Information) showed peak potential values that were almost unchanged with increasing scan rate. The peak currents increased with increasing square root of the scan rate in the whole range of scan rates tested, indicating a diffusion-controlled electrode reaction process. From the i_p versus $v^{1/2}$ plot, the electrochemical surface of the modified electrode was calculated by use of the Randles equation, $i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$, with $D = 7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.²⁹ The obtained value was 0.208 ± 0.004 ($n = 5$) cm^2 , which was 1.4 times higher than the electrochemical surface area calculated for the bare GCE ($0.145 \pm 0.007 \text{ cm}^2$). Cyclic voltammograms from 1 mM HQ solutions at different potential scan rates were also recorded (results not shown); similarly, they exhibited a linear dependence between the anodic or cathodic i_p values with $v^{1/2}$. In order to evaluate the possible steric hindrance or electrostatic interference caused by the negatively charged $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ions on measurement of the modified electrode electrochemical surface area, this surface area was also calculated by using hydroquinone as electrochemical probe, yielding a similar value ($0.205 \pm 0.008 \text{ cm}^2$, $n = 5$) to that obtained with $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$.

HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE Biosensor. The developed electrode platform was used to construct a bienzyme biosensor for the determination of cholesterol, which implied the coimmobilization of both HRP and ChOx onto the electrode surface. As depicted in Figure 1, ChOx catalyzes the oxidation of cholesterol to form hydrogen peroxide, whose reduction is catalyzed by HRP in the presence of hydroquinone as the redox mediator, and the electrochemical reduction of the formed quinone was used for monitoring the overall reaction.

Development of the bienzyme biosensor was accomplished by performing first the evaluation of a single-enzyme HRP bioelectrode. This was carried out by following a fabrication procedure similar to that described earlier except for the ChOx incorporation. Optimization of the implied variables involved the detection of hydrogen peroxide.

Figure 3 shows cyclic voltammograms from solutions containing 1 mM hydroquinone and 2 mM H_2O_2 , recorded with HRP biosensors constructed without MNPs and coated MWCNTs

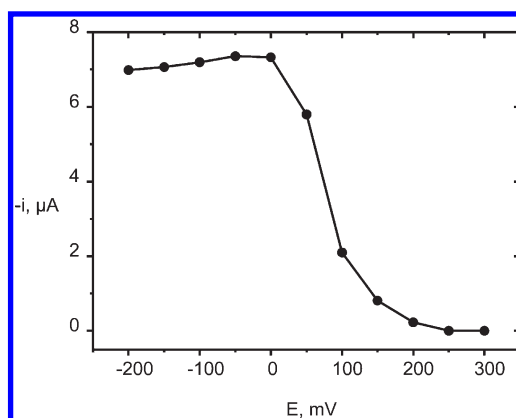


Figure 4. Effect of applied potential value on the amperometric detection of 0.1 mM H_2O_2 in the presence of 1 mM hydroquinone obtained at HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE.

(HRP/GA/GCE), without MWCNTs (HRP/GA-MNP/GCE), without MNPs (HRP/GA/PDDA/MWCNT/GCE), and at HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE. As expected, a much higher reduction peak current was obtained at HRP/GA-MNP/GCE when compared with that observed for HRP/GA/GCE, which can be attributed, on the one hand, to the higher enzyme loading immobilized on the functionalized MNPs and, on the other hand, to the formation of a passivating layer when GA is directly adsorbed onto the GCE surface. The cyclic voltammogram recorded at the biosensor prepared with PDDA/MWCNTs showed a potential shift toward less negative values and a slight increase in the reduction peak current. Since impurities of metal catalysts were not detected by SEM and high-resolution TEM analysis of MWCNT, we assumed that this electrocatalytic effect was caused by the oxidized carbon surface of the nanotubes.^{30,31} These effects were much more evident with HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE, showing the advantageous combination of electrocatalysis accrued by modification with CNTs (with subsequent enhancement of the electron-transfer rate) with efficient and stable enzyme immobilization onto the GA-functionalized MNPs. Therefore, the developed strategy was able to provide enhanced electroanalytical responses, avoiding coating of the electrode surface with cross-linking reagents.

Figure 4 shows the influence of applied potential for the amperometric detection of hydrogen peroxide in the presence of hydroquinone at HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE. The steady-state current exhibited the expected S-shaped behavior with almost constant high values for potentials more negative than 0.0 V. In order to minimize potential interference from other electroactive substances potentially present in serum such as ascorbic acid or uric acid, a detection potential of -0.05 V was selected for further work.

The influence of PDDA/MWCNT loading onto the GC electrode on the amperometric response of the biosensor was evaluated by preparing bioelectrodes in the 0–12 μg PDDA/MWCNT range. The obtained results (Figure S4, Supporting Information) revealed that the steady-state current practically did not vary from an 8 μg loading. This amount assured complete electrode modification and, therefore, it was selected for further work. The loading of GA-MNPs was also optimized. Figure 5a shows that the steady-state current increased up to a loading of 20 μg , while higher loadings produced a remarkable decrease,

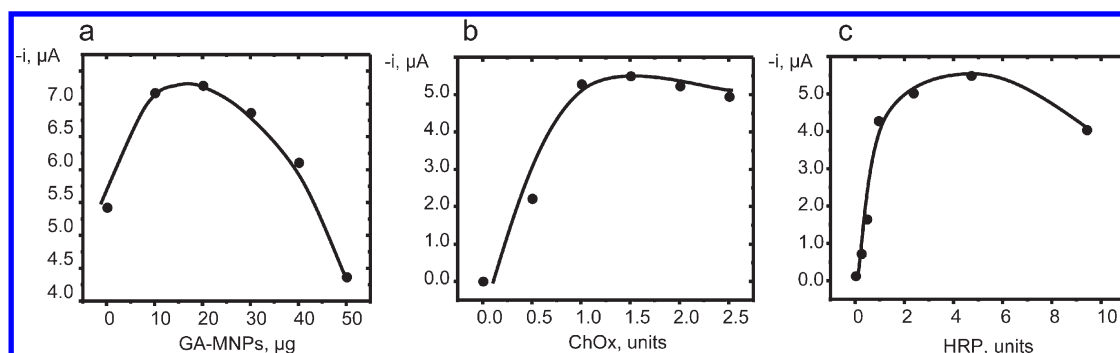


Figure 5. Optimization of (a) GA-MNP, (b) ChOx, and (c) HRP loadings. Conditions: (a) 8 μg of PDDA/MWCNTs, 0.1 mM H_2O_2 , 1 mM hydroquinone, 9.4 units of HRP; (b) 0.2 mM cholesterol and 4.7 units of HRP; (c) 0.2 mM cholesterol and 1 unit of ChOx. Each plotted point is the mean value of the measurements carried out with three different bioelectrodes.

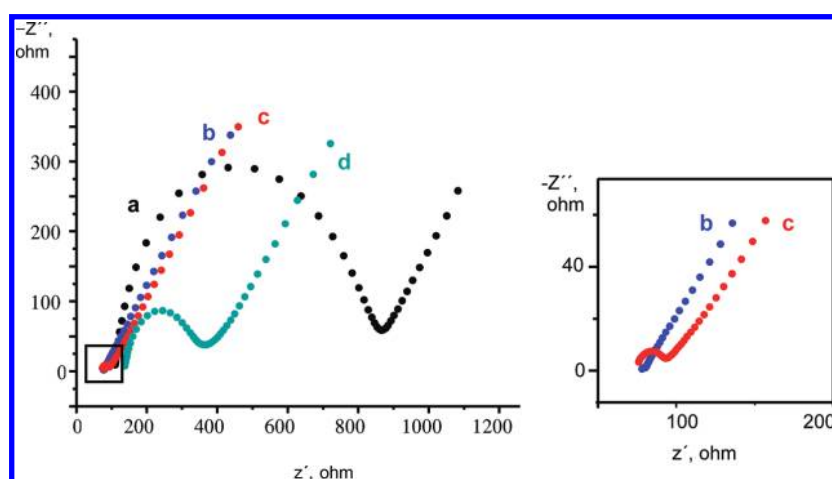


Figure 6. Nyquist plots recorded from a 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0.1 M KCl solution at (a) bare GCE, (b) PDDA/MWCNT/GCE, (c) GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE, and (d) HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE.

probably due to blocking of the electrode active surface. Thus, 20 μg was selected for further work.

The optimized parameters mentioned above were taken for the subsequent construction of the bienzyme ChOx/HRP biosensor. Therefore, both the ChOx and HRP loadings were also optimized by measuring the amperometric responses to 0.2 mM cholesterol of different bienzyme biosensors prepared with a constant 4.7 units of HRP loading and various ChOx loadings ranging between 0 and 2.5 units. Figure 5b shows that the steady-state current increased with the amount of ChOx up to approximately 1 unit, and then it slightly decreased as a probable consequence of the electrode blocking. A similar set of experiments was performed by constructing biosensors with 1 unit of ChOx and various HRP loadings between 0 and 9.4 units. As can be observed in Figure 5c, the largest response was achieved for 4.7 units of HRP. Accordingly, 1 unit of ChOx and 4.7 units of HRP were selected as enzyme loadings for the bienzyme biosensor preparation.

The step-by-step biosensor construction was also characterized by electrochemical impedance spectroscopy. Figure 6 compares the Nyquist plots obtained in a 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0.1 M KCl solution for bare GCE, PDDA/MWCNT/GCE, GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE, and ChOx/HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE. As can be observed, the quasi-ideal

capacitor behavior observed for PDDA/MWCNT/GCE, with a very small electron-transfer resistance (R_{ct}) value ($2 \pm 2 \Omega$), changed upon incorporation of GA-MNPs with a slight increase in the R_{ct} value ($21 \pm 6 \Omega$), which evidenced that the layer of GA-functionalized nonconducting MNPs blocked partially the electrode surface but with sufficient available conducting sites to allow the electrochemical reaction to be performed. Furthermore, as expected, incorporation of the enzymes on the functionalized MNPs produced a noticeable increase in the electron-transfer resistance ($R_{\text{ct}} = 216 \pm 32 \Omega$), which confirmed the successful immobilization of the enzymes.

The study of the influence of pH on the amperometric response of the biosensor (results not shown) demonstrated that the highest current was attained at pH 7.5. Furthermore, the hydroquinone concentration in solution was also optimized. The steady-state current dramatically increased from 0 to 0.1 mM, showing a much lower increase up to 2 mM hydroquinone concentration. Therefore, 0.50 mM was selected as the concentration of redox mediator to be used in subsequent work.

Analytical Characteristics of HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE Biosensor. By use of the optimized working parameters, a linear calibration plot for cholesterol ($r = 0.996$) was obtained in the 0.01–0.95 mM concentration range (Figure 7). The limit of detection (LOD), 0.85 μM , was calculated according

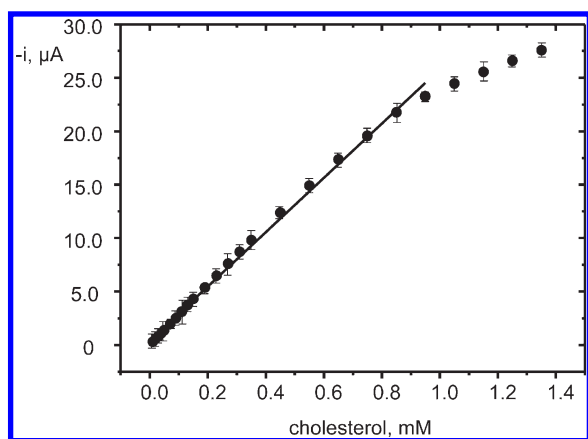


Figure 7. Calibration plot for cholesterol obtained at the HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor.

to the $3s_b/m$ criterion, where s_b was estimated as the standard deviation ($n = 10$) of the amperometric signals corresponding to different solutions of cholesterol at the lowest concentration level in the range of linearity (i.e., 0.01 mM) and m was the slope of the calibration graph, $25.4 \mu\text{A}/\text{mM}$. The sensitivity achieved can be ranged among the best ones when compared with data reported in the literature for other CNT-based cholesterol biosensors. The slope value is much higher than that achieved with a layer-by-layer PPD(PDDA/ChOx)_n/MWCNT/AuE configuration ($m = 0.175 \mu\text{A}/\text{mM}$)¹⁰ at a detection potential of +0.7 V, as well as those obtained with a ChOx/PANI/MWCNT/ITO electrode ($m = 6.8 \mu\text{A}/\text{mM}$ at $E_{\text{det}} = 0.28 \text{ V}$),¹⁶ and with a biosensor involving vertically aligned CNTs with immobilized ChOx, HRP, and cholesterol esterase ($m = 8.5 \mu\text{A}/\text{mM}$ at $E_{\text{det}} = 0.4 \text{ V}$).³² Only the slope value reported for a layer-by-layer PDDA(MWCNT/ChOx)₅/graphite biosensor configuration was higher ($m = 136.5 \mu\text{A}/\text{mM}$).²³ Nevertheless, it should be noted that the detection limit achieved with the HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor was 35 times lower and the range of linearity was considerably wider.

Figure 7 shows typical Michaelis–Menten kinetics behavior, as was confirmed by calculating the x parameter, 0.98, from the corresponding Hill plots ($[\log(i_{\text{max}}/i) - 1]$) versus the log of the substrate concentration). Consequently, the apparent Michaelis–Menten constant, (K_M^{app}) and the maximum reaction rate value (V_m) were calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plot. The obtained values were $K_M^{\text{app}} = 1.57 \text{ mM}$ and $V_m = 47.6 \mu\text{A}$. This K_M^{app} value was 2 times higher than that reported recently for ChOx in aqueous solutions.³³ However, it is important to remark that the obtained K_M^{app} value was significantly lower than those reported for other electrode configurations such as the designs involving a PPD(PDDA/ChOx)_n/MWCNT/AuE biosensor (7.17 mM)²⁴ and ChOx immobilized on poly(vinylferrocenium) perchlorate film-coated Pt electrodes (3.9 mM).³⁴ This fact suggests that the Michaelis–Menten equilibrium was favored in our electrode design, probably as a consequence of the microenvironment provided by GA-MNPs.

Regarding the stability of the ChOx/HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor, different aspects were evaluated. First, the repeatability of successive amperometric measurements for five different 0.1 mM cholesterol solutions carried out with the same biosensor was checked. A relative standard deviation value (RSD) of 5.8% was calculated for the steady-state current.

Table 1. Results Obtained in Analysis of Human Sera with the HRP/ChOx/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE Biosensor

sample ^a	cholesterol, mM			avg found	RSD, %	recovery, %
	added	found				
1	2.0	2.01, 2.16, 1.87, 1.97, 2.09	2.02	5.5	101.0	
2	5.0	5.02, 4.84, 5.13, 5.28, 4.75	5.01	4.3	100.2	
3	7.0	7.18, 7.17, 7.61, 6.94, 7.27	7.23	3.3	103.3	

^a Samples were spiked with cholesterol at the 2.0 (sample 1), 5.0 (sample 2), and 7.0 (sample 3) mM concentration levels.

Furthermore, the reproducibility of the responses obtained with five different biosensors was also evaluated. The mean value of the performed measurements yielded a RSD value of 8.2%. Moreover, the lifetime of a single ChOx/HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor was checked by performing three daily measurements for 0.05 mM cholesterol. The amperometric response did not show significant differences (within $\pm 3 \times$ standard deviation of the mean value measured the first day) for at least 14 days, without any regeneration procedure applied to the bioelectrode surface. Similar results were obtained when the assay was performed with 0.1 mM cholesterol. This working stability is remarkably better than that reported for other CNT-based biosensors (1 week),^{19,20,23} and it can be attributed to the successful enzyme immobilization strategy on the GA-MNPs retaining their biological activity.

The effect of temperature on the bienzyme biosensor response was studied by measuring the steady-state current of 0.1 mM cholesterol solutions at temperatures ranging from 25 to 60 °C. The current exhibited a fast increase with temperature up to 45 °C and decreases for higher temperatures, probably due to denaturation of the enzymes. From the $\ln i$ versus $1/T$ plot in the 25–40 °C range, and according to the Arrhenius equation, an activation energy value of 10.68 kJ/mol was calculated. This value is lower than that obtained when ChOx was immobilized onto MWCNT/SiO₂/Chit composites, $E_a = 42.6 \text{ kJ}/\text{mol}$,²⁰ and much lower than that given for the immobilization of ChOx onto polyaniline, $E_a = 71.1 \text{ kJ}/\text{mol}$,³⁵ thus revealing the high enzyme activity when GA-MNP/PDDA/MWCNT was used as immobilization substrate.

Determination of Cholesterol in Spiked Human Serum. As a straightforward real application of the bienzyme bioelectrode, the analysis of human serum spiked with cholesterol at three different concentration levels covering usual ranges in human sera, 2.0, 5.0, and 7.0 mM, was accomplished. As described in the Experimental Section, a 100- μL aliquot of serum was diluted with 0.1 M PBS (pH 7.5) solution up to 5.0 mL, and the determination of cholesterol was performed by applying the standard additions method involving the addition of 0.1 mM cholesterol aliquots. Table 1 summarizes the obtained results, where it can be seen that mean recoveries ranged between 100% and 103% with relative standard deviations of 5.5%, 4.3%, and 3.3%. These results demonstrated fairly well the usefulness of the developed ChOx/HRP/GA-MNP/PDDA/MWCNT/GCE biosensor for determination of free cholesterol in serum samples with practically no sample treatment.

CONCLUSIONS

The novel electrochemical interfaces constructed from functionalized MNPs and properly wrapped CNTs have been

demonstrated to be useful for the preparation of multi-enzyme biosensors. The excellent analytical performance for determination of cholesterol achieved with the bienzyme biosensor constructed by immobilizing ChOx and HRP on the developed transducer platforms allows us to conclude that the strategy can be successfully employed for such a purpose. The coupling of beneficial properties of the modified MNPs, to improve the immobilization of the enzymes onto the composite material, with the electrocatalytic effect and stability provided by PDDA-wrapped carbon nanotubes leads to an enhanced sensitivity of the biosensing platform compared to that achieved with other methods described in the literature using biosensors prepared with carbon nanotubes solely. It is hoped that the successful strategy developed for the first time in this work may be easily extended for the preparation of other multienzyme biosensing designs.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Four figures, showing FT-IR spectrum, magnetization curves, cyclic voltammograms, and effect of PDDA/MWCNT loading on amperometric detection as described in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax: +34913944329. E-mail: pingarro@quim.ucm.es.

■ ACKNOWLEDGMENT

R.V. acknowledges a Ramón & Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01, CTQ2009-12650, and CTQ2009-09351) and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642, program AVANSENS, is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *622*, 15–20.
- (2) Li, D.; Teoh, W. Y.; Gooding, J. J.; Selomulya, C.; Amal, R. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1767–1777.
- (3) Cheng, Y.; Liu, Y.; Huang, J.; Li, K.; Xian, Y.; Zhang, W.; Jin, L. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 2588–2594.
- (4) Qu, S.; Wang, J.; Kong, J.; Yang, P.; Chen, G. *Talanta* **2007**, *71*, 1096–1102.
- (5) Theres Baby, T.; Ramaprabhu, S. *Talanta* **2010**, *80*, 2016–2022.
- (6) Li, J.; Wei, X.; Yuan, Y. *Sens. Actuators, B* **2009**, *139*, 400–406.
- (7) Lu, B.-W.; Chen, W.-C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, *304*, e400–e402.
- (8) Yang, L.; Ren, X.; Tang, F.; Zhang, L. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 889–895.
- (9) Piao, Y.; Jin, Z.; Lee, D.; Lee, H.-J.; Na, H.-B.; Hyeon, T.; Oh, M.-K.; Kim, J.; Kim, H.-S. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3192–3199.
- (10) Ran, X.-Q.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Hong, C.-L.; Qian, X.-Q. *Colloids Surf., B* **2010**, *79*, 421–426.
- (11) Zhou, Y. L.; Li, Y. Z. *Colloids Surf., A* **2004**, *233*, 129–135.
- (12) Li, N.; Zhao, H. W.; Yuan, R.; Peng, K. F.; Chai, Y. Q. *Electrochim. Acta* **2008**, *54*, 235–241.
- (13) Muthirulam, P.; Velmurugan, R. *Colloids Surf., B* **2011**, *83*, 347–354.
- (14) Qin, X.; Wang, H.; Wang, X.; Li, S.; Miao, Z.; Huang, N.; Chen, Q. *Mater. Sci. Eng., C* **2009**, *29*, 1453–1457.
- (15) Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1083–1100.
- (16) Dhand, C.; Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. *Anal. Biochem.* **2008**, *383*, 194–199.
- (17) Gopalan, A. I.; Lee, K. P.; Ragupathy, D. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2211–2217.
- (18) Yang, M.; Yang, Y.; Yang, H.; Shen, G.; Yu, R. *Biomaterials* **2006**, *27*, 246–255.
- (19) Yang, M.; Yang, Y.; Qu, F.; Lu, Y.; Shen, G.; Yu, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *571*, 211–217.
- (20) Tan, X.; Li, M.; Cai, P.; Luo, L.; Zou, X. *Anal. Biochem.* **2005**, *337*, 111–120.
- (21) Tsai, Y.-C.; Chen, S.-Y.; Lee, C.-A. *Sens. Actuators, B* **2008**, *135*, 96.
- (22) Solanki, P. R.; Kaushik, A.; Ansari, A. A.; Tiwari, A.; Malhotra, B. D. *Sens. Actuators, B* **2009**, *137*, 727–735.
- (23) Manjunatha, R.; Nagaraju, D. H.; Suresh, G. S.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F.; Venkatesha, T. V. J. *Electroanal. Chem.* **2011**, *651*, 24–29.
- (24) Guo, M.; Chen, J.; Li, J.; Nie, L.; Yao, S. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1992–1998.
- (25) Cui, R.; Huang, H.; Yin, Z.; Gao, D.; Zhu, J.-J. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1666–1673.
- (26) Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2209–2211.
- (27) Villalonga, R.; Villalonga, M. L.; Díez, P.; Pingarrón, J. M. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12858–12864.
- (28) Cao, H.; He, J.; Deng, L.; Gao, X. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 7974–7980.
- (29) Gooding, J. J.; Praig, V. G.; Hall, E. A. H. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2396–2402.
- (30) Haddad, R.; Cosnier, S.; Maaref, A.; Holzinger, M. *Sens. Lett.* **2009**, *7*, 801–805.
- (31) Li, J.; Yu, Q.; Peng, T. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 377–381.
- (32) Wisitsoraat, A.; Karuwan, C.; Wong-ek, K.; Phokharatkul, D.; Sritongkham, P.; Tuantranont, A. *Sensors* **2009**, *9*, 8658–8668.
- (33) Sun, Y.; Yang, H.; Wang, W. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 2049–2055.
- (34) Özer, B. C.; Özyörük, H.; Çelebi, S. S.; Yıldız, A. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, *40*, 262–265.
- (35) Wang, H. Y.; Mu, S. L. *Sens. Actuators, B* **1999**, *56*, 22–30.

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución de Cloruro de poli(dialildimetilamonio) 0.25% (p/p): preparada por dilución de 0.625 mL del PDDA 20 % (p/p) (Sigma) en 50 mL de una disolución acuosa de NaCl 0.5 M.
- Dispersión de nanotubos de carbono modificados con poli(dialildimetilamonio) 0.8 mg mL⁻¹: se prepara a partir de 4 mg de MWCNTs (Nanolab, de 30 ± 15 nm de diámetro) modificados con PDDA en 5 mL de agua desionizada por agitación mediante ultrasonidos hasta la obtención de una dispersión homogénea.
- Dispersión conjunta de nanotubos de carbono modificados con poli(dialildimetilamonio) (0.8 mg mL⁻¹) y nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído (2 mg mL⁻¹): se prepara a partir de 1 mg de GA-MNPs en 0.5 mL de la dispersión de PDDA/MWCNTs 0.8 mg mL⁻¹.
- Disolución de Colesterol oxidasa (ChOx) 500 U mL⁻¹: se disuelven 15 mg de colesterol oxidasa, suministrada en polvo liofilizado (from *Brevibacterium* sp. EC 1.1.3.6, 34 U mg⁻¹ sólido, Sigma), en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4. A partir de esta disolución se preparan distintas alícuotas y se congelan a – 50 °C hasta su empleo. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de Peroxidasa de rábano (HRP) 1880 U mL⁻¹: se disuelven 5 mg de peroxidasa (tipo II, from Horseradish EC 1.11.1.7, 188 U mg⁻¹ sólido, Sigma) en 0.5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de Glutaraldehído 3 %: se prepara por dilución de 120 µL de glutaraldehído 25% (v/v) (Aldrich) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5.

- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.1 M: se preparada por dilución de 9 μL de H_2O_2 35% (Scharlau) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de hidroquinona 0.1 M: se disuelven 11 mg de hidroquinona (Sigma) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de colesterol 0.02 M: se disuelven 0.0386 g de colesterol (Sigma) en 0.2 mL de Triton X-100 (Merck) a 60 °C, y posteriormente se diluye en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado conteniendo Triton X-100 al 1%. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M: se disuelve la cantidad adecuada de ambas sales en agua desionizada. El pH se ajusta al valor adecuado con NaOH 2 M.
- Disolución de trabajo para la determinación de colesterol: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5, conteniendo las cantidades adecuadas de hidroquinona y Triton X-100 para que las concentraciones finales sean 0.5 mM y 1%, respectivamente.

2.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

2.1.2.1. FABRICACIÓN DE UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS CON GLUTARALDEHIDO (GA-MNPs/PDDA/MWCNTs)

La preparación del material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs puede describirse en varias etapas:

Preparación de nanopartículas magnéticas:

El procedimiento seguido para la preparación de nanopartículas de magnetita ($n\text{Fe}_3\text{O}_4$) se basa en un método descrito en la bibliografía [Kang, 1996], con algunas modificaciones. En este proceso es necesario llevar a cabo la reacción en disolución acuosa de pH 11 – 12 con una relación molar $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}=0.5$. Brevemente, se disuelven 5.4 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) y 2 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) en 25 mL de HCl (Scharlau) 0.5 M bajo atmósfera de N_2 . Esta disolución se adiciona lentamente a 250 mL de NaOH (Scharlau) 1.5 M y se somete a agitación mecánica y a tratamiento de ultrasonidos con burbujeo continuo de N_2 . Finalmente, el precipitado negro formado se separa por decantación magnética y se lava exhaustivamente con agua desionizada hasta pH neutro, y otras dos veces más con etanol, dejándose secar a vacío a temperatura ambiente.

Modificación con APTES:

Las nanopartículas magnéticas $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ (MNPs) se han preparado basándose en un método ya descrito en la bibliografía [Cao, 2009]. Para ello, 300 mg de las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ se dispersan en una mezcla de 600 mL de etanol y 4 mL de agua con agitación de ultrasonidos. A continuación se adicionan 120 μL de (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES) (Sigma) y la mezcla se agita mecánicamente durante 7 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas obtenidas se separan por decantación magnética y se purifican mediante cinco ciclos de redispersión en etanol y separación con decantación magnética. Finalmente, las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ obtenidas se secan a vacío a temperatura ambiente.

Las nanopartículas magnéticas así obtenidas se han caracterizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR). Las imágenes de microscopía fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía Electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid, empleando un microscopio electrónico de transmisión (Transmisión Electron Microscope, TEM), modelo JEM-2000 FX, de la marca JEOL. Por su parte, los espectros de infrarrojo se han obtenido empleando un espectrofotómetro de Perkin-Elmer. Además, el estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas sintetizadas se ha llevado a cabo empleando un magnetómetro MPMS (Magnetic Property Measurement System) tipo SQUID (Superconducting Quantum Interference Device).

Modificación con glutaraldehído:

Para ello, 1 mg de las nanopartículas magnéticas silanizadas ($n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$) se suspende en 1 mL de glutaraldehído (Aldrich) al 3 %, preparado en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5, agitándose suavemente durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizan cuatro lavados con agua con decantación magnética con el fin de eliminar el glutaraldehído no enlazado a la superficie de las partículas magnéticas.

Preparación del material híbrido:

Finalmente, 1 mg de las partículas magnéticas modificadas con glutaraldehído (GA-MNPs) se dispersan en 0.5 mL de la suspensión de PDDA/MWCNTs (0.8 mg mL^{-1}) (preparada como se indica en el *Apartado 1.1.2.1.*) mediante agitación con ultrasonidos durante 5 minutos. La suspensión del material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su empleo.

El material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs se ha caracterizado mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes de microscopía fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía Electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid. Se ha empleado un microscopio electrónico de barrido de alta resolución con cañón de emisión de campo

(Field Emisión Scanning Electron Microscope, FE-SEM), modelo JSM-6335F, y un microscopio electrónico de transmisión (Transmisión Electron Microscope, TEM), modelo JEM-2000 FX, ambos de la marca JEOL.

En la *Figura 69* se muestra un esquema del procedimiento seguido para la modificación con glutaraldehído, así como la preparación de la suspensión del material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs.

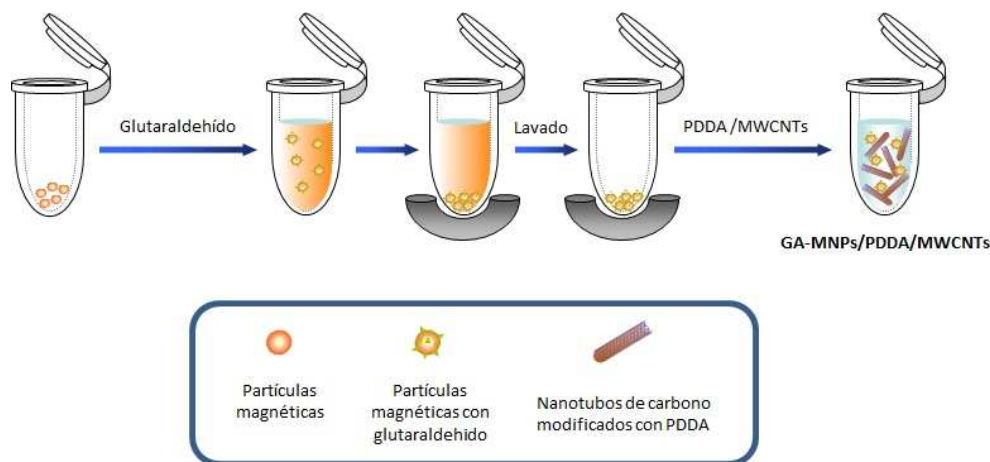


Figura 69. Esquema de la preparación del material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs.

2.1.2.2. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO MODIFICADO CON UN MATERIAL HÍBRIDO DE POLI(DIALILDIMETILAMONIO) Y NANOTUBOS DE CARBONO CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS CON GLUTARALDEHIDO (GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE)

Primero, antes de modificar la superficie del electrodo de carbono vitrificado se lleva a cabo su pretratamiento como se ha indicado en el Capítulo anterior.

A continuación, la superficie del electrodo se modifica con una alícuota de 10 μL de la suspensión GA-MNPs/PDDA/MWCNTs (PDDA/MWCNTs 0.8 mg mL^{-1} y GA-MNPs 2 mg mL^{-1}), preparada como se ha indicado en el *Apartado 2.1.2.1.*, y posteriormente se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Finalmente el electrodo modificado se aclara con agua, quedando preparado para la incorporación de las enzimas.

2.1.2.3. COINMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS COLESTEROL OXIDASA Y PEROXIDASA DE RÁBANO

A continuación, una vez preparado el electrodo, se procede a inmovilizar las enzimas colesterol oxidasa (ChOx) y peroxidasa de rábano (HRP) sobre su superficie.

Sobre la superficie del electrodo GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE se deposita una alícuota de 5 μL de una disolución mezcla de peroxidasa de rábano (HRP) 940 U mL^{-1} y colesterol oxidasa (ChOx) 200 U mL^{-1} y se deja reaccionar durante aproximadamente dos horas, hasta sequedad, a temperatura ambiente. Finalmente el biosensor se aclara con agua desionizada y se almacena en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, dejando esperar un tiempo para que alcance la temperatura ambiente antes de realizar las medidas electroquímicas.

En la *Figura 70* se muestra el esquema seguido para la preparación del biosensor bioenzimático de colesterol, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato de la colesterol oxidasa.

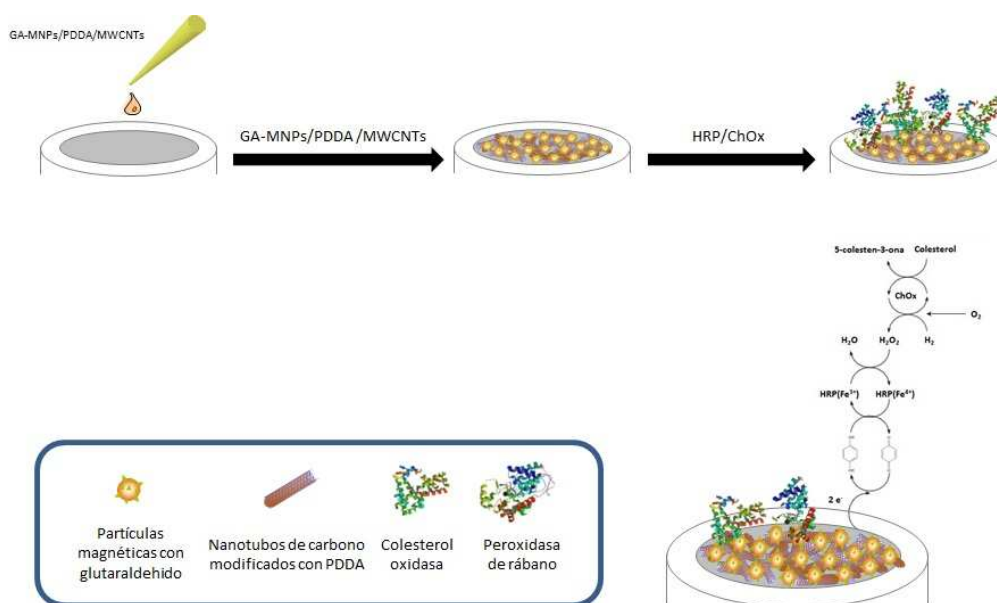


Figura 70. Esquema de la preparación del biosensor de colesterol basado en el electrodo GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Las medidas amperométricas y voltamperométricas se han realizado empleando un potenciostato BAS 100B, provisto de un soporte BAS C2 EF-1080 y controlado mediante el software de análisis electroquímico BAS 100W versión 2.0. Para las medidas de impedancia electroquímica se ha empleado un potenciostato μ Autolab tipo III, controlado por el software FRA2 (Ecochimie). El montaje potencioestático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo de carbono vitrificado (Metrohm 6.084.010, de 3 mm de diámetro), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BAS MF-2063) y un electrodo auxiliar de alambre de Pt (BAS MW-1032), empleándose una célula electroquímica (BAS VC-2) de 5 mL.

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica y amperometría en disoluciones agitadas.

2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Para obtener las curvas intensidad – potencial se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 5 mL de la disolución de trabajo correspondiente conteniendo H_2O_2 en la concentración deseada, y se mantiene con agitación magnética constante hasta el momento en que se procede a la medida. Tras seleccionarse los potenciales inicial, de retorno y final, así como la velocidad de barrido, se procede al registro del voltamperograma cíclico correspondiente con la disolución en reposo.

2.1.3.2. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

Para obtener los amperogramas, se introducen los tres electrodos en la célula de medida, que contiene 5 mL de la disolución de trabajo correspondiente, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dura el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona la cantidad adecuada de H_2O_2 o colesterol, y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

2.1.3.3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUIMICA

Para obtener los diagramas de Nyquist se sumergen los electrodos en la célula electroquímica, que contiene 5 mL de una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5mM en KCl 0.1M. Las medidas se llevan a cabo al potencial de equilibrio (correspondiente a paso de corriente cero) del sistema en estudio (E_{dc}), con una amplitud de excitación sinusoidal (E_0) de 10 mV. La impedancia se midio a 50 frecuencias armónicas desde 0.04 Hz a 10^5 Hz siguiendo una distribución logarítmica.

2.1.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

El biosensor desarrollado se ha empleado para la determinación de colesterol en muestras de suero humano a las que se adicionó colesterol a tres niveles de concentración: 2, 5 y 7 mM. Con este fin, el suero sólido comercial (Sigma) se reconstituye en 1 mL de la disolución de colesterol correspondiente y se mezcla cuidadosamente hasta su total disolución.

2.1.4.1. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

La determinación de colesterol se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado y, con el fin de minimizar el efecto matriz, empleando el método de adiciones estándar. Para ello, el biosensor desarrollado se sumerge en la célula de trabajo que contiene 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5 conteniendo hidroquinona 0.5 mM y Triton X-100 1%, y se aplica un potencial de -0.05 V (vs. Ag/AgCl), agitando mecánicamente a velocidad constante.

En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta una alícuota de 100 μL de la disolución de muestra a la célula de medida. A continuación se realizan adiciones sucesivas de alícuotas de 25 μL de una disolución patrón de colesterol 0.02 M, monitorizándose la intensidad de corriente de reducción de la quinona generada en la reacción enzimática que se produce en la superficie del biosensor, la cual se relaciona con la concentración de colesterol presente en la muestra.

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS GA-MNPs

En la *Figura 71* se ha representado esquemáticamente el proceso seguido para la preparación de las nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído. Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita ($n\text{Fe}_3\text{O}_4$) se recubrieron con una capa delgada de sílice funcionalizada con grupos amino (APTES). Posteriormente, las partículas magnéticas silanizadas, con grupos amino expuestos, pueden reaccionar con el glutaraldehído por formación de un enlace imina o base de Schiff.

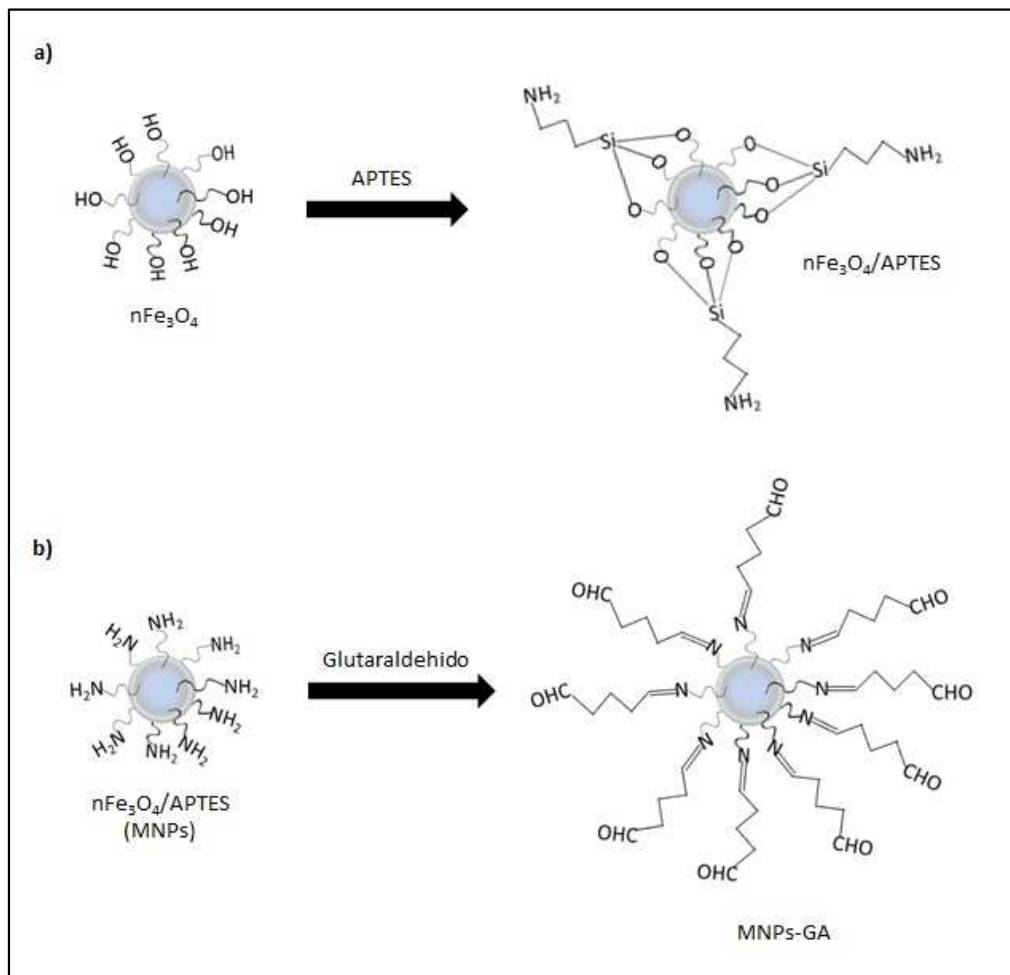


Figura 71. Esquema de la preparación de (a) nanopartículas de magnetita modificadas con APTES y (b) nanopartículas modificadas con glutaraldehído.

Para su empleo en aplicaciones analíticas, las partículas magnéticas deben ser estables en suspensión durante un largo periodo de tiempo, pero deben sedimentar rápidamente en presencia de un campo magnético, y redispersarse al cesar la aplicación de dicho campo y agitar suavemente. Las nanopartículas de Fe_3O_4 son inestables en disolución acuosa de pH neutro. Un método frecuentemente empleado para mejorar sus características es la modificación superficial de las mismas por hidrólisis de agentes de acoplamiento de tipo silano como el (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES), que disminuyen su punto isoeléctrico, aumentando su estabilidad. El núcleo no magnético de la sílice debilita la interacción dipolar entre las nanopartículas, evitando de este modo, como se ha dicho, la formación de aglomerados [Cao, 2009]. La caracterización microscópica de las nanopartículas $\text{nFe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ se realizó mediante microscopía de transmisión (TEM), calculándose un tamaño medio de las nanopartículas antes y después de la modificación con APTES de 14 ± 7 nm ($n=250$) y 17 ± 9 nm ($n=250$), respectivamente. A modo de ejemplo, en la *Figura 72* se muestra una micrografía de transmisión electrónica de las nanopartículas de magnetita modificadas con APTES.

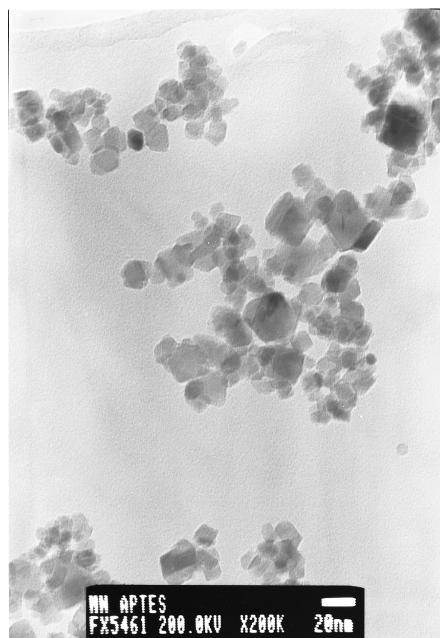


Figura 72. Micrografía de transmisión electrónica (TEM) del material $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$.

La *Figura 73* muestra los espectros de absorción FTIR obtenidos para las nanopartículas de magnetita antes y después de la modificación con APTES. En ambos casos se observan dos bandas a 590 y 639 cm^{-1} que se asignan al desdoblamiento de la banda de vibración de tensión de los enlaces Fe-O a 570 cm^{-1} [Cao, 2009]. Además, puede observarse una banda menos intensa a 448 cm^{-1} , que corresponde al desplazamiento hipsocrómico de la banda ν_2 del enlace Fe-O. Por otro lado, las bandas Si-OH y Si-O-Si del recubrimiento de silano aparecen solapadas a una frecuencia de 1020 cm^{-1} . La presencia de los grupos Si-OH también se hace patente por la aparición de dos bandas anchas a 3698 cm^{-1} y 3200 cm^{-1} , que pueden atribuirse a los grupos hidroxilo libres y a los unidos por puentes de hidrógeno a los átomos de Si. Finalmente, la presencia de los grupos amino en las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ se pone de manifiesto por la banda que aparece a 1628 cm^{-1} , característica de la vibración de tensión del NH_2 .

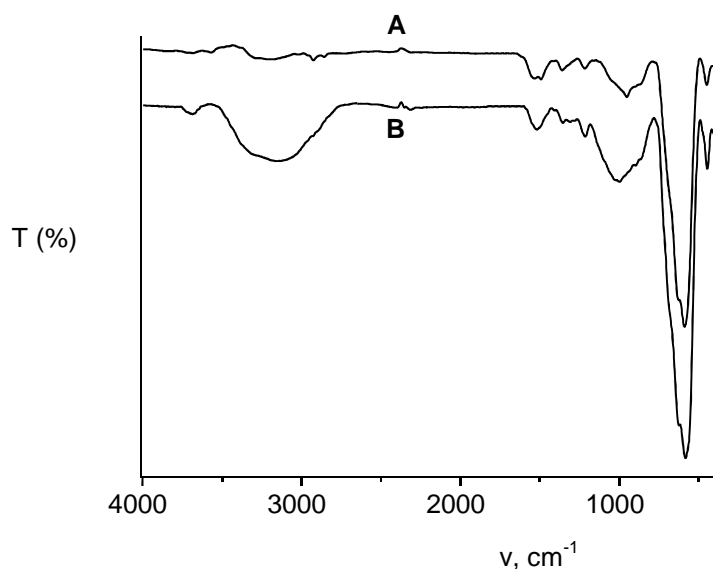


Figura 73. Espectros FTIR de (A) $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y (B) $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$.

Con el fin de comprobar que las nanopartículas de magnetita mantienen sus propiedades magnéticas después de la modificación con APTES, se registraron las curvas de magnetización con los resultados mostrados en la *Figura 74*. Como puede observarse, tanto las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ como las $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ exhiben curvas características del comportamiento superparamagnético, lo que indica que las

nanopartículas se redispersan en disolución sin que ocurra la agregación típica de los materiales ferromagnéticos [Cao, 2009]. La magnetización de saturación de las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ fue 60 emu g^{-1} , siendo ligeramente menor (57.3 emu g^{-1}) para las nanopartículas modificadas $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, debido a la capa de silano depositada en su superficie. Esta característica hace que las nanopartículas sintetizadas sean de gran utilidad para su manipulación bajo un campo magnético externo.

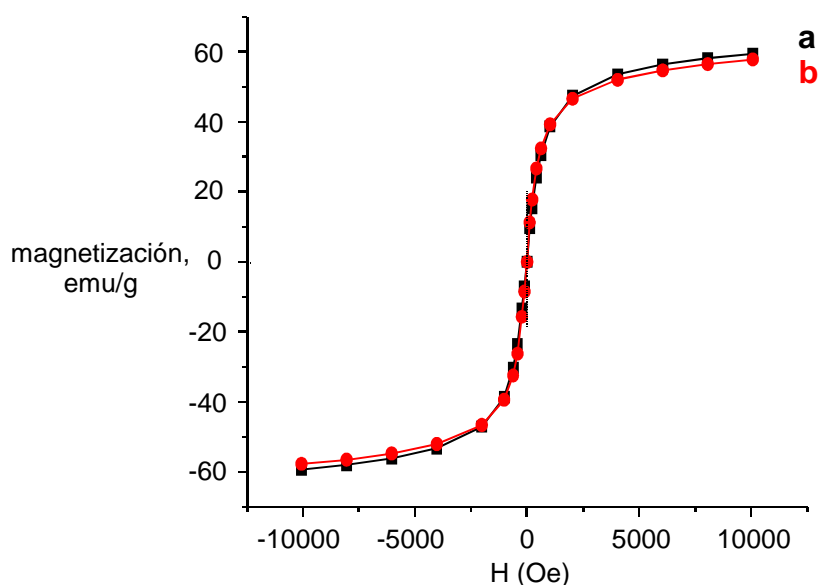


Figura 74. Curvas de magnetización de las nanopartículas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) y $n\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ (b).

La capa de sílice que recubre las partículas magnéticas proporciona grupos amino que permiten, a su vez, insertar posteriormente grupos funcionales útiles para la inmovilización estable de biomoléculas [Cao, 2009]. En este trabajo se aprovechó la capacidad de estos grupos de reaccionar con el glutaraldehído por formación de un enlace imina o base de Schiff. Al ponerse en contacto las nanopartículas modificadas con glutaraldehído (MNPs-GA) con la disolución de enzima, se producirá la adición nucleófila entre los grupos amino de las lisinas que posee la enzima y los grupos carbonilo libres del glutaraldehído, formándose un nuevo enlace imina mediante el cual la proteína queda inmovilizada sobre la membrana [Zhang, 2007]_b. El procedimiento seguido para la modificación de las nanopartículas con GA aprovecha el comportamiento superparamagnético de éstas para su manipulación. La aplicación de

un campo magnético externo en las etapas de modificación con GA y lavado fuera de la superficie sensora, evita los fenómenos de pasivación del electrodo que ocurren cuando se modifica directamente el electrodo, mejorando la sensibilidad.

Con el fin de demostrar la correcta funcionalización de las nanopartículas con glutaraldehído, en la *Figura 75* se muestran los voltamperogramas cíclicos de una disolución de H_2O_2 e hidroquinona cuando se emplea un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas magnéticas con y sin glutaraldehído, que han sido incubadas en una disolución de HRP y lavadas antes de su inmovilización sobre la superficie del electrodo. Con fines comparativos se muestran además los voltamperogramas cíclicos para la hidroquinona en ausencia de H_2O_2 . Como puede observarse, cuando se emplean las nanopartículas modificadas con glutaraldehído, el pico de reducción es mucho más intenso que en el caso de emplear nanopartículas sin modificar, lo que indica que en ausencia de GA se ha inmovilizado mucha menor cantidad de enzima, perdiéndose en las respectivas etapas de lavado.

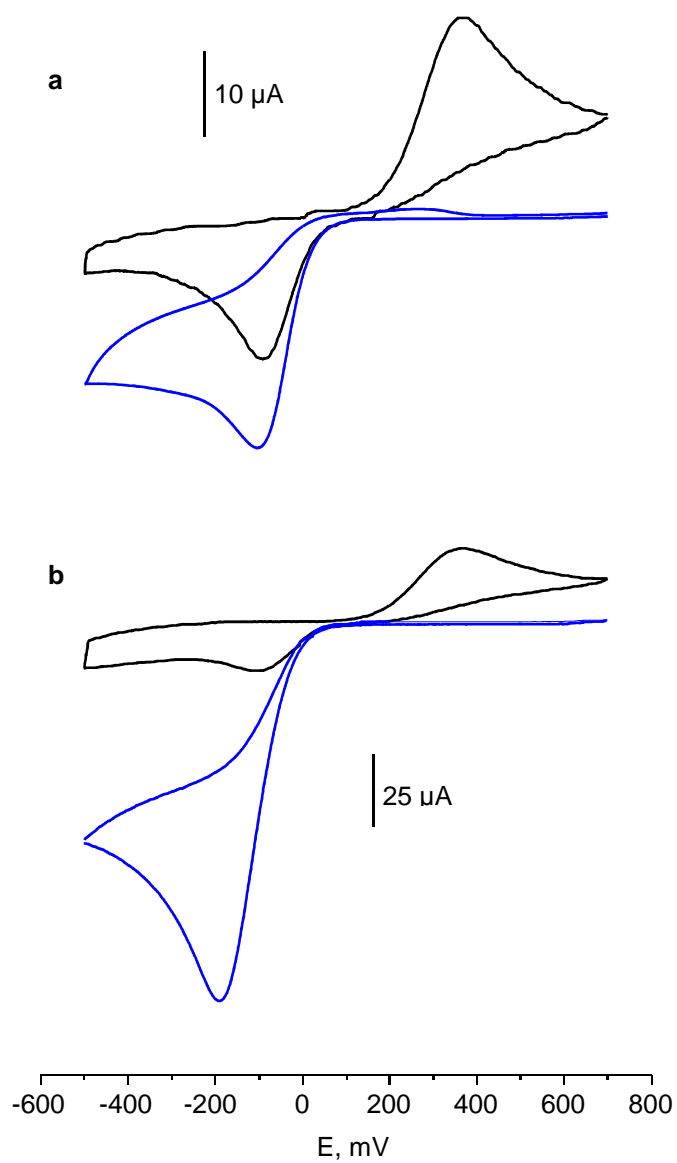


Figura 75. Voltamperogramas cíclicos de disoluciones de hidroquinona 1 mM sin H_2O_2 (—) y con H_2O_2 2 mM (—) sobre los electrodos: (a) HRP-MNPs/GCE y (b) HRP-GA-MNPs/GCE. Medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.5; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

2.2.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO GA-MNPs/PDDA/MWCNTs

Con el fin de aprovechar las excelentes propiedades de los nanotubos de carbono junto con las inherentes a las nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído sintetizadas previamente, se ha preparado un material híbrido de ambos componentes siguiendo el procedimiento que se describe en el *Apartado 2.1.2.1*. La habilidad de adhesión y la capacidad formadora de películas que posee el PDDA que recubre a los nanotubos, junto con la porosidad de la matriz de silano que recubre las nanopartículas magnéticas puede favorecer la interacción entre ambos nanomateriales mediante un proceso de inclusión. En la *Figura 76* se muestran las micrografías de barrido electrónico obtenidas para electrodos modificados con PDDA/MWCNTs (a) y con el material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs (b). Asimismo, la *Figura 76c* muestra una micrografía de transmisión electrónica del material híbrido GA-MNPs/PDDA/MWCNTs, donde se aprecian las nanopartículas magnéticas modificadas adheridas a la pared exterior de los nanotubos de carbono.

El electrodo modificado con el material híbrido así obtenido se caracterizó electroquímicamente por voltamperometría cíclica empleando diferentes velocidades de barrido de potencial, en una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM y KCl 0.1 M. Los voltamperogramas representados en la *Figura 77* muestran picos de oxidación y reducción bien definidos típicos de un sistema cuasi-reversible. Además, la corriente de pico de oxidación aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en todo el intervalo de velocidades estudiado, indicando un control difusivo de la corriente del proceso electroquímico. A partir de esta representación y utilizando la ecuación de Randles, se calculó el área electroquímica del electrodo GA-MNPs/PDDA/MWCNTs, obteniéndose un valor de $0.208 \pm 0.004 \text{ cm}^2$ (n=5). De forma similar, las áreas electroquímicas calculadas para los electrodos GCE y PDDA/MWCNTs/GCE fueron $0.145 \pm 0.007 \text{ cm}^2$ (n=5) y $0.227 \pm 0.004 \text{ cm}^2$ (n=5). Como era de esperar, el área electroquímica aumenta con la presencia de los nanotubos de carbono, disminuyendo ligeramente con la presencia de las nanopartículas magnéticas debido a su carácter no conductor.

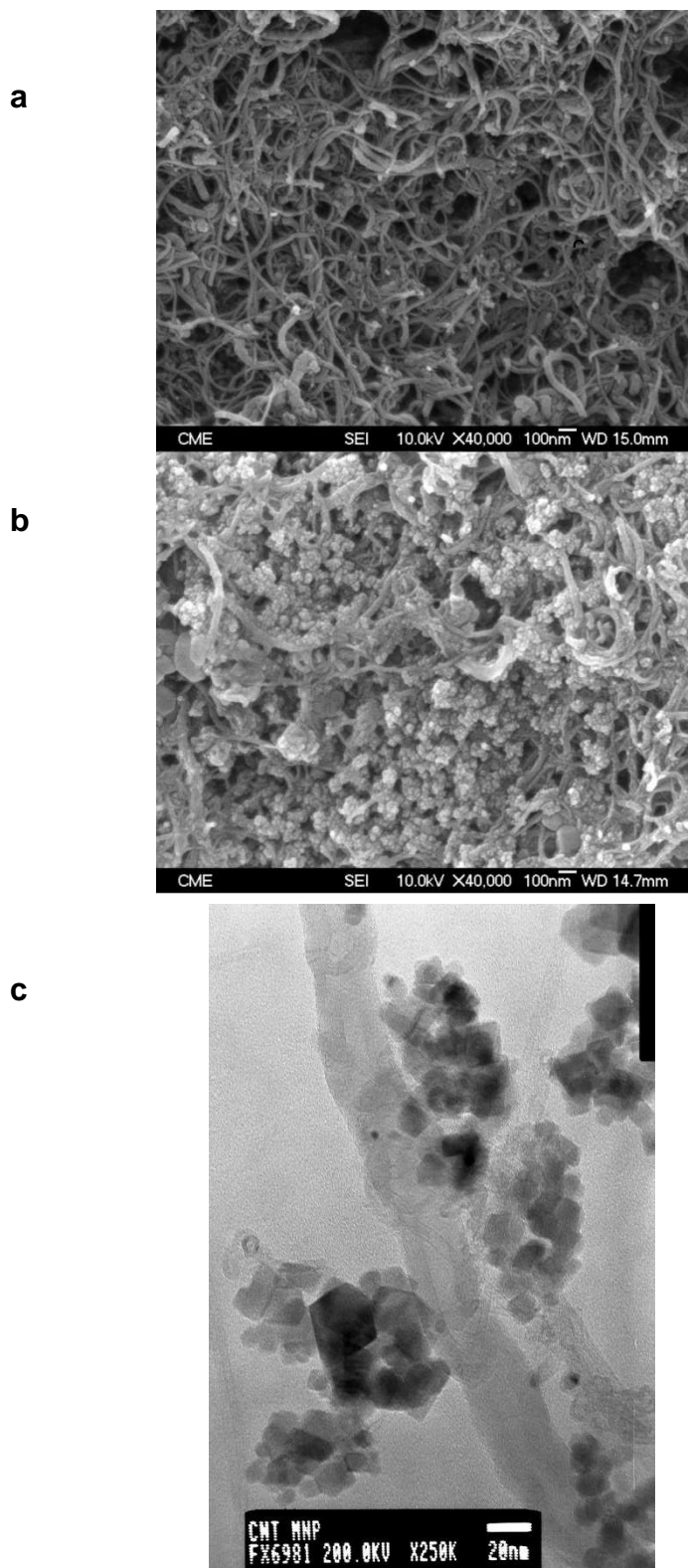


Figura 76. Micrografías de barrido electrónico (SEM) obtenidas para los electrodos PDDA/MWCNTs/GCE (a) y GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE (b). Micrografía de transmisión electrónica (TEM) del material GA-MNPs/PDDA/MWCNTs..

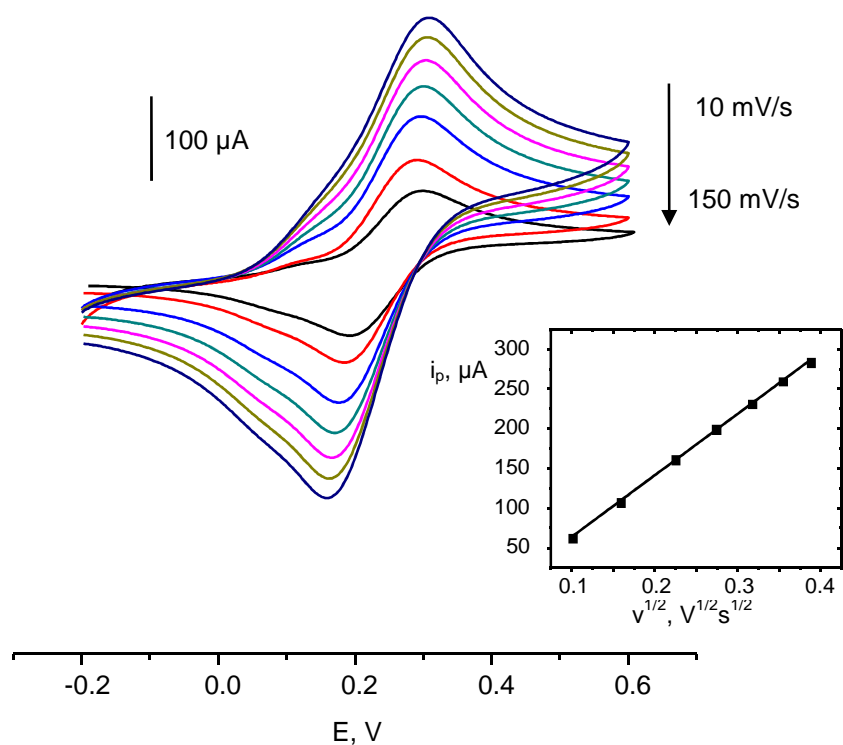


Figura 77. Efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta en voltamperometría cíclica de disoluciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre el electrodo GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Recuadro: Variación de la corriente de oxidación con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial.

Se estudió también la respuesta del mediador hidroquinona sobre la superficie electródica mediante voltamperometría cíclica empleando distintas velocidades de barrido de potencial. En la *Figura 78* se han representado los resultados obtenidos de la medida de los picos de oxidación y de reducción, observándose la variación lineal de la corriente con la raíz cuadrada de la velocidad, lo que indica un control difusivo de la corriente de ambos procesos sobre la superficie del electrodo GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Estos resultados se utilizaron también para calcular el área electroquímica superficial, obteniéndose un valor similar ($0.205 \pm 0.008 \text{ cm}^2$, $n=5$) al obtenido con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$.

Asimismo, al representar ΔE_p vs. v (Figura 78), se observa una ligera curvatura para valores elevados de velocidad, lo que indica la posible adsorción de las formas reducida y oxidada del mediador sobre la superficie del electrodo a altas velocidades de barrido.

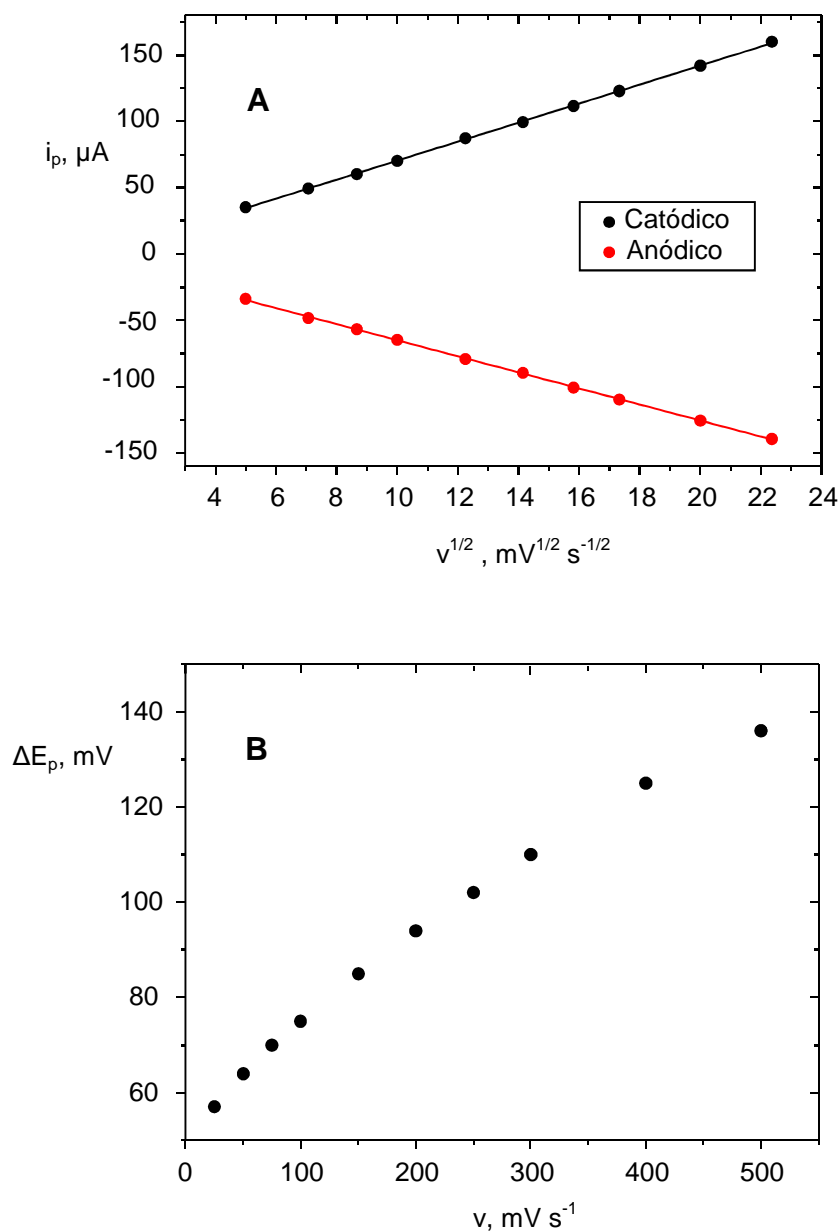


Figura 78. (A) Variación de las corrientes de pico anódico y catódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial. (B) Variación de la separación de picos anódico y catódico con la velocidad de barrido de potencial. Medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.5 con Hidroquinona 1 mM. Electrodo: GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

2.2.3. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs

La plataforma electródica desarrollada se ha empleado para la construcción de un biosensor bienzimático de colesterol mediante la coinmovilización de las enzimas ChOx y HRP siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 2.1.2.3.*, y empleando hidroquinona como mediador. La secuencia de reacciones que tienen lugar es la misma que en el biosensor bienzimático anterior (ver *Figura 62*), en la que la enzima ChOx cataliza la oxidación de colesterol generando H₂O₂, cuya reducción es catalizada por la HRP en presencia de hidroquinona como mediador. Al igual que en dicha configuración, la quinona formada es reducida electroquímicamente sobre la superficie del electrodo modificado.

2.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

En primer lugar, con el fin de optimizar las variables implicadas en la detección del peróxido de hidrógeno, se preparó un biosensor de HRP en ausencia de la enzima ChOx. En la *Figura 3* del artículo (pág. 7811 del mismo) se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para disoluciones que contienen H₂O₂ 2 mM e HQ 1 mM registrados con los biosensores HRP/GA/GCE, HRP/GA-MNPs/GCE, HRP/GA/PDDA/MWCNTs/GCE y HRP/GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

Como era de esperar, cuando se emplea el biosensor HRP/GA-MNPs/GCE se obtiene una corriente de reducción mucho mayor que cuando se utiliza HRP/GA/GCE, lo que se atribuye, por un lado, a la mayor cantidad de enzima inmovilizada sobre las nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído y, por otro lado, a la formación de una capa de pasivación sobre la superficie del electrodo cuando el GA se adsorbe directamente sobre el GCE. Por otro lado, cuando se construye el biosensor empleando el híbrido PDDA/MWCNTs se observa un desplazamiento del potencial de pico hacia potenciales menos negativos y un ligero aumento de la corriente del pico de reducción lo que, debido a que no se detectaron impurezas metálicas en el análisis de MWCNTs por SEM y TEM, se atribuye al efecto electrocatalítico de los nanotubos de carbono [*Haddad, 2009; Li, 2005*]. Estos efectos fueron mucho más pronunciados cuando se emplea el electrodo HRP/GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, observándose la combinación de las propiedades electrocatalíticas de los nanotubos de carbono junto

con la inmovilización estable y eficiente de la enzima sobre las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con GA. Comparando esta última configuración biosensora con el biosensor HRP/GA/PDDA/MWCNTs/GCE, en ausencia de MNPs, se pone nuevamente de manifiesto que cuando el GA se adsorbe directamente sobre los nanotubos de carbono ocurre una pasivación de la superficie sensora, constituyendo así una gran ventaja llevar a cabo el proceso de inmovilización de GA sobre las MNPs fuera del electrodo, lo cual disminuye el ensuciamiento superficial y aumenta la sensibilidad del biosensor.

Con el fin de seleccionar el potencial más adecuado para la determinación de peróxido de hidrógeno con la superficie electródica desarrollada, en la *Figura 4* del artículo (pág. 7811 del mismo) se muestra la influencia del potencial aplicado al electrodo sobre la corriente de reducción de la quinona sobre el biosensor HRP/GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Como puede observarse, la mayor sensibilidad se obtiene para potenciales más negativos que 0.0 V. Con el fin de lograr una buena selectividad, evitando la posible interferencia de compuestos como los ácidos ascórbico y úrico, finalmente se seleccionó un potencial de detección de -0.05 V.

Se optimizaron las cantidades de PDDA/MWCNTs y GA-MNPs depositadas sobre el electrodo, con el fin de obtener la mejor señal electroquímica para la detección del H_2O_2 . En la *Figura 79* se observa cómo, en ausencia de partículas magnéticas, la corriente en estado estacionario aumenta a medida que lo hace la carga de PDDA/MWCNTs, permaneciendo prácticamente constante a partir de un valor de 4 μg . Con el fin de asegurar el máximo recubrimiento, finalmente se seleccionó una carga de PDDA/MWCNTs de 8 μg para el resto de trabajo.

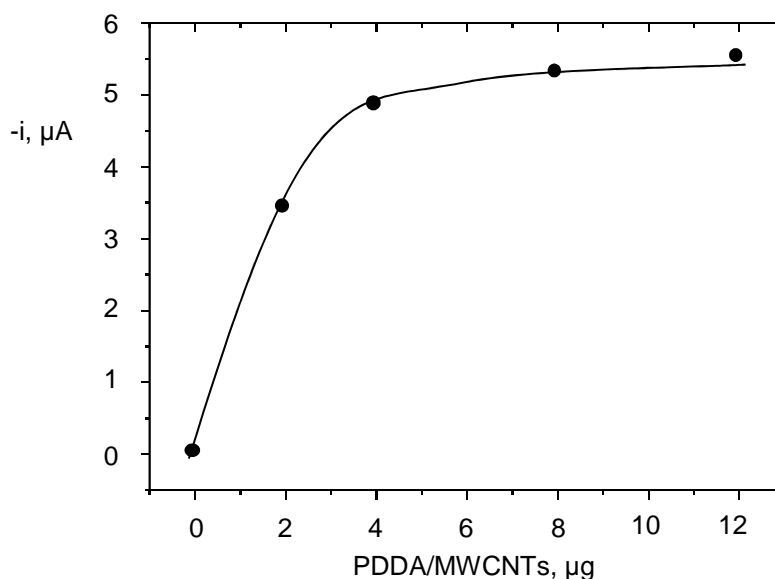


Figura 79. Influencia de la cantidad de PDDA/MWCNTs sobre la señal amperométrica de reducción de la quinona sobre el biosensor HRP/PDDA/MWCNTs/GCE; H_2O_2 0.1 mM e HQ 1mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.5; $E_{ap} = -0.05$ V.

En la Figura 5a del artículo (pág. 7812 del mismo) se han representado los resultados obtenidos en el estudio de la influencia que, sobre la respuesta amperométrica, tiene la progresiva incorporación de GA-MNPs en el intervalo 0 – 50 µg, observándose que la corriente en estado estacionario aumenta hasta 20 µg, valor a partir del cual disminuye, probablemente debido al boqueo de la superficie activa de los nanotubos de carbono. Finalmente se seleccionaron 20 µg de GA-MNPs como cantidad óptima para la construcción del biosensor.

Una vez optimizadas las variables que afectan a la detección de H_2O_2 , se estudió la coinmovilización de las enzimas ChOx y HRP sobre el electrodo modificado. En las Figuras 5b y 5c del artículo (pág. 7812 del mismo) se muestra la influencia de la cantidad de ambas enzimas sobre la respuesta amperométrica obtenida para adiciones de colesterol 0.2 mM empleando distintos biosensores preparados con distintas cantidades de ChOx (0 – 2.5 U) y de HRP (0 – 9.4 U), manteniendo en cada caso constante la concentración de la otra enzima. Como puede observarse, la combinación de enzimas en la que se obtiene la mayor corriente en estado estacionario es 1U de ChOx y 4.7U de HRP, que fue seleccionada para la construcción del biosensor

bienzimático. Al igual que en el biosensor diseñado anteriormente, esta relación HRP/ChOx de cinco veces asegura un exceso de peroxidasa suficiente como para que no exista envenenamiento por el peróxido generado en la primera reacción enzimática.

Finalmente, se ha estudiado la influencia que tiene el pH sobre la respuesta amperométrica del biosensor en el intervalo comprendido entre 6.5 y 9.0 (*Figura 80*). Como puede observarse, la señal en estado estacionario aumenta hasta un valor de 7.5, disminuyendo para valores pH superior seguramente debido a la inestabilidad del mediador hidroquinona, que sufre una rápida autooxidación en medio acuoso a pHs básicos.

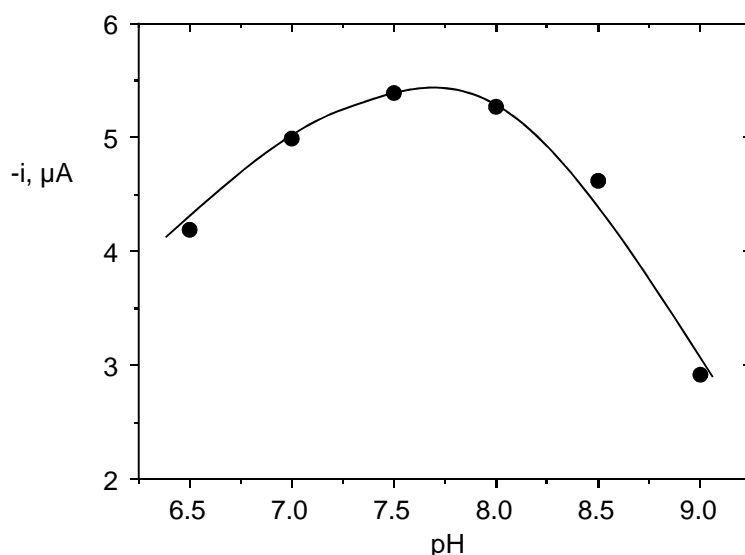


Figura 80. Influencia del pH sobre la respuesta del biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE; colesterol 0.2 mM e HQ 1mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1%; $E_{ap} = -0.05$ V.

Con el fin de seleccionar la concentración de hidroquinona más adecuada para la determinación de colesterol, se estudió la influencia que ésta tiene sobre la respuesta amperométrica del biosensor bienzimático en el intervalo de 0 a 2 mM. En la *Figura 81* se observa un aumento muy rápido de la señal hasta una concentración 0.1 mM, valor a partir del cual la corriente aumenta de forma ligera. Estos resultados llevaron a escoger el valor 0.5 mM para realizar los estudios posteriores.

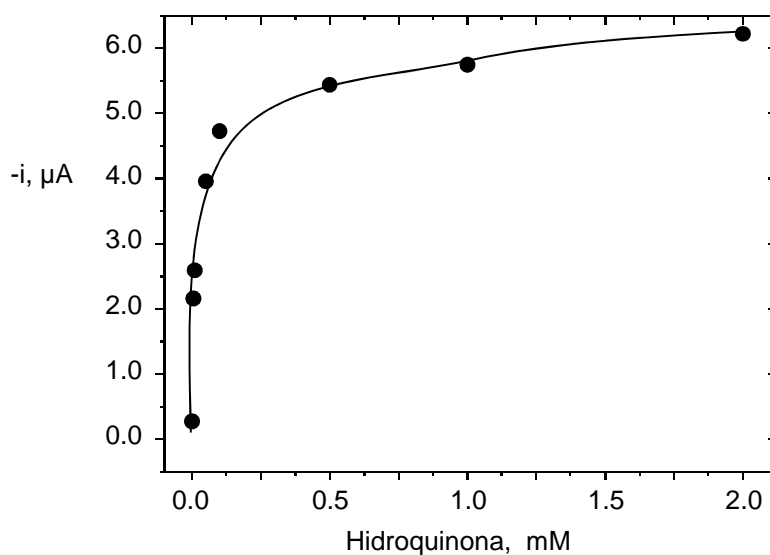


Figura 81. Influencia de la concentración de hidroquinona sobre la respuesta del biosensor *ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE*; colesterol 0.2 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 7.5; $E_{ap} = -0.05$ V.

Caracterización

El biosensor desarrollado se caracterizó mediante espectroscopía de impedancia electroquímica realizando un seguimiento de cada una de las etapas implicadas en su construcción. En la *Figura 6* del artículo (pág. 7812 del mismo) se muestran los gráficos de Nyquist correspondientes a un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono (PDDA/MWCNTs/GCE), con nanotubos de carbono y nanopartículas magnéticas (GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE), y el del biosensor bienzimático de colesterol (*ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE*). Con fines comparativos se muestra también el espectro de impedancias para un electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE).

Como ya se había observado en el capítulo anterior, el gráfico de Nyquist para el electrodo de carbono vitrificado es el que muestra una región semicircular de diámetro mayor, con un valor de la resistencia a la transferencia de carga de $745 \pm 48 \Omega$. Sin embargo, en presencia de los nanotubos de carbono modificados con PDDA, esta resistencia disminuye hasta $2 \pm 2 \Omega$. Por otro lado, el comportamiento de capacitor cuasi-ideal observado para el electrodo PDDA/MWCNTs/GCE se modifica

debido a la incorporación de GA-MNPs, produciéndose un ligero aumento de la resistencia a la transferencia de carga hasta $21 \pm 6 \Omega$, lo que indica que las nanopartículas magnéticas modificadas no conductoras bloquean parcialmente la superficie electroquímica activa. Finalmente, como era de esperar, la incorporación de las enzimas supone un gran aumento en la resistencia a la transferencia de electrones ($216 \pm 32 \Omega$), lo que confirma la eficiente inmovilización de las biomoléculas.

2.2.3.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

En las condiciones experimentales optimizadas previamente, se obtuvo el calibrado de colesterol representado en la *Figura 7* del artículo (pág. 7813 del mismo), pudiéndose observar también, en la *Figura 82*, algunas de las señales amperométricas registradas. Además, en la *Tabla 12* se resumen las características analíticas del método desarrollado para la determinación de colesterol con el biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE, que se comparan con las obtenidas utilizando las configuraciones anteriores: ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

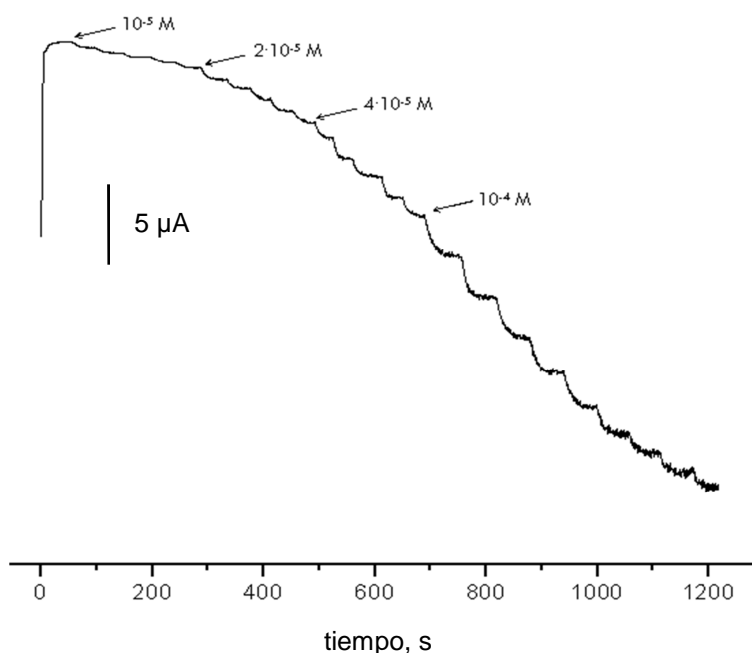


Figura 82. Señales amperométricas para la determinación de colesterol con el biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE.

Tabla 12. Características analíticas de los métodos para la determinación de colesterol empleando los biosensores desarrollados en este trabajo.

Electrodo	E_{ap} , V	IL, mM	Pte, $\mu\text{A}/\text{mM}$	LOD, μM	RSD*, %	K_M^{ap} , mM	Estab.** operac.	Tiempo de resp., s
ChOx/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	0.6 vs Ag/AgCl	0.02-1.2	2.23 ± 0.06	4.4 ($3s_b/m$)	2.8 (n=5)	0.89	7 días (88%)	30-35
ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/MWCNTs/GCE	-0.05 vs Ag/AgCl	0.01-1.05	18.6 ± 0.4	2.2 ($3s_b/m$)	5.1 (n=5)	2.18	8 días (78%)	15-20
ChOx/HRP-GA-MNP/PDDA/MWCNTs/GCE	-0.05 vs Ag/AgCl	0.01 - 0.95	25.4 ± 0.7	0.85 ($3s_b/m$)	5.8 (n=5)	1.57	14 días (84%)	15-20

*repetibilidad con un biosensor; ** porcentaje de la corriente inicial

El intervalo lineal, comprendido entre 0.01 y 0.95 mM ($r=0.996$), es equivalente al de los biosensores anteriores, pero la pendiente del calibrado, $25.4 \mu\text{A mM}^{-1}$, es sensiblemente superior. Al igual que en otros casos, el límite de detección se calculó con el criterio $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado y s_b es la desviación estándar ($n=10$) de las señales amperométricas de diferentes disoluciones de colesterol al nivel de concentración más bajo del intervalo estudiado (0.01 mM). El valor obtenido, $0.85 \mu\text{M}$, es notablemente inferior al de las configuraciones basadas en nanopartículas de oro. Cuando se comparan las características analíticas de este biosensor con las de otros diseños descritos en la bibliografía basados en nanotubos de carbono (ver *Tabla 10*), se observa, por ejemplo, que la pendiente obtenida es mucho mayor que la correspondiente a un bioelectrodo ChOx/PANI/MWCNTs/ITO ($m = 6.8 \mu\text{A mM}^{-1}$) [Dhand, 2008], y que la que se alcanza empleando un biosensor trienzimático basado en un electrodo de nanotubos de carbono alineados verticalmente modificado con ChOx, HRP y ChE ($m = 8.5 \mu\text{A mM}^{-1}$) [Wisitorsaat, 2009]. Únicamente un biosensor basado en un electrodo de grafito modificado con PDDA(MWCNTs/ChOx)₅ [Manjunatha, 2011] posee una pendiente mayor ($m = 136.5 \mu\text{A mM}^{-1}$), aunque cabe destacar que el límite de detección obtenido con el biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE es 35 veces menor y que el rango lineal obtenido es considerablemente más amplio.

Parámetros cinéticos

El calibrado representado en la *Figura 7* del artículo (pág. 7813 del mismo) muestra la forma típica de un comportamiento cinético de Michaelis-Menten, tal como confirmó el valor del parámetro “ x ”, 0.98, calculado a partir de la correspondiente representación de Hill ($[\log(i_{\max}/i)-1]$) vs. log de la concentración de sustrato). Al igual que en los biosensores anteriores, la constante de Michaelis-Menten, K_M^{ap} , y la velocidad máxima de reacción (V_m) se calcularon a partir de la representación de Lineweaver-Burk. Los valores obtenidos fueron $V_m = 47.6 \mu A$ y $K_M^{ap} = 1.57 \text{ mM}$, valor que es dos veces mayor que el recientemente publicado para la enzima ChOx en disolución [Sun, 2011]. Además, como puede apreciarse en la *Tabla 12*, la constante K_M^{ap} es menor que la obtenida empleando la configuración bienzimática con nanopartículas de oro. Asimismo, el valor obtenido es menor que el publicado utilizando la configuración PPD(PDDA/ChOx)_n/MWCNTs/AuE (7.17 mM) [Guo, 2004], así como el obtenido cuando se inmoviliza la ChOx sobre un electrodo de Pt modificado con una película de poli(vinilferroceno) (3.9 mM) [Özer, 2007], lo que sugiere que en este diseño electródico se favorece la estabilidad de las enzimas probablemente debido al microambiente proporcionado por las nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído.

2.2.3.3. ESTABILIDAD

El estudio de la repetibilidad de las medidas realizadas con un mismo biosensor para cinco disoluciones de colesterol 0.1 mM, proporcionó una desviación estándar relativa RSD = 5.8 %. Por otro lado, también se investigó la reproducibilidad de las medidas de cinco disoluciones de colesterol 0.5 mM realizadas con cinco biosensores diferentes preparados al mismo tiempo y de la misma manera, obteniéndose un valor de RSD = 8.2 %, lo que demuestra una precisión aceptable en la fabricación de los biosensores.

Finalmente, el tiempo de vida de un biosensor individual de ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNT/GCE se evaluó realizando diariamente tres medidas de una disolución de colesterol 0.05 mM. Como puede observarse en la *Figura 83*, la respuesta amperométrica no varió significativamente en el entorno de ± 3 veces la

desviación estándar de la media de las medidas realizadas el primer día, durante catorce días de medida. El biosensor desarrollado mantiene un 84% y un 75% de la respuesta inicial en el 14^o y 15^o día de medida, respectivamente. Esta estabilidad de trabajo es mayor que las otros biosensores de colesterol descritos, como son un biosensor basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con un material híbrido de MWCNTs/Chit/PtNPs (60% en el séptimo día de uso) [Tsai, 2008], un biosensor basado en un electrodo de grafito modificado con PDDA(MWCNTs/ChOx)₅ (92% en el séptimo día de uso) [Manjunatha, 2011] y un biosensor basado en un electrodo de oro modificado con MPS y siete capas alternas de PSS y PtNPs/CNTs/Chit [Yang, 2006]_a (90% en el séptimo día de uso). Además, la estabilidad de este biosensor también es mayor que las obtenidas con las otras configuraciones desarrolladas en este trabajo basadas en el material híbrido MWCNTs/PDDA/AuNPs. Estos resultados pueden ser atribuidos a la bondad de la estrategia de modificación de las enzimas sobre las nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído.

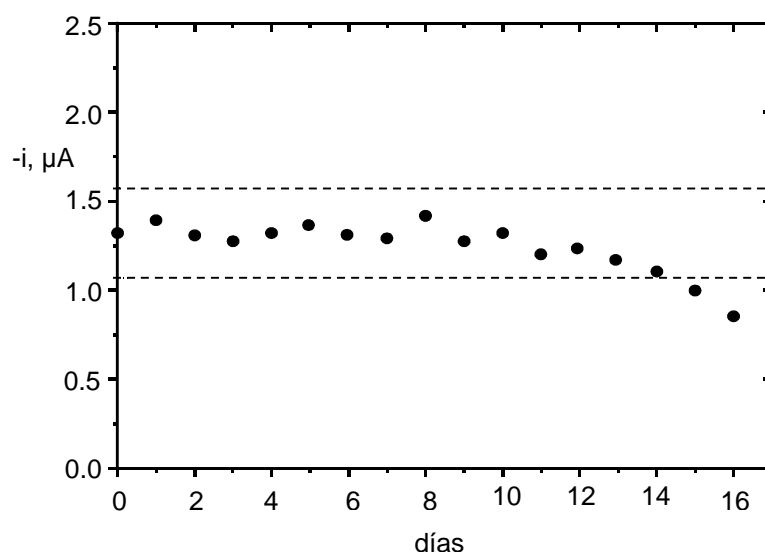


Figura 83. Diagrama de control construido para el biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE. Cada punto representa la media de la medida por triplicado de una disolución de colesterol 0.05 mM.

Además, se ha evaluado la estabilidad térmica del biosensor bienzimático midiendo la corriente en estado estacionario de disoluciones de colesterol 0.1 mM en el intervalo de 25 a 60 °C. En la *Figura 84* se puede observar un aumento de la señal hasta 45 °C, disminuyendo para temperaturas superiores probablemente debido a la desnaturalización de la enzima. A partir de la representación $\ln i$ vs. $1/T$ en el intervalo de temperaturas entre 25 y 40, y teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius ($\ln i = -E_a/RT$), se puede calcular un valor de energía de activación de $10.68 \text{ kJ mol}^{-1}$, el cual es menor que el obtenido cuando la enzima ChOx se inmoviliza sobre compósitos de MWCNTs/SiO₂/Chit ($E_a=42.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) [Tan, 2005], o cuando se coinmoviliza con PANI ($E_a=42.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) [Wang, 1999], y muy similar al obtenido cuando la enzima ChOx se inmoviliza sobre nanopartículas magnéticas (9.3 kJ mol^{-1}) [Kouassi, 2005]. Estos resultados indican una elevada actividad de la enzima cuando se emplea el material GA-MNPs/PDDA/MWCNTs como sustrato de inmovilización.

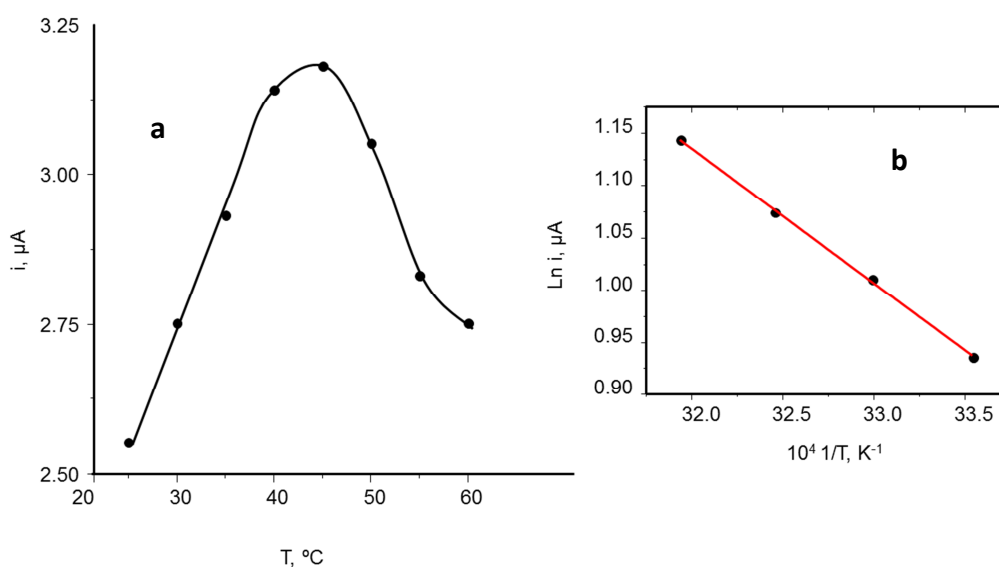


Figura 84. (a) Influencia de la temperatura sobre la respuesta del biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE y (b) representación de Arrhenius; colesterol 0.1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M y Triton 1% a pH 7.5; $E_{ap} = -0.05 \text{ V}$.

2.2.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO

Al igual que en los biosensores anteriores, en este caso también se eligió el suero humano para comprobar la utilidad analítica del biosensor desarrollado. La muestra se enriqueció con colesterol a tres niveles de concentración: 2, 5 y 7 mM, que como se ha dicho, son concentraciones que corresponden a los niveles normales de colesterol en este tipo de muestras. Siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 2.1.4.1.*, una alícuota de 100 μL de la muestra de suero enriquecido se adicionó a la célula de medida, conteniendo 5 mL de PBS 0.1 M de pH 7.5, y se aplicó el método de adiciones estándar por adiciones sucesivas de colesterol 0.1 mM. A modo de ejemplo, en la *Figura 85* se muestran algunas adiciones sucesivas de colesterol sobre una muestra de suero enriquecido con colesterol 5 mM.

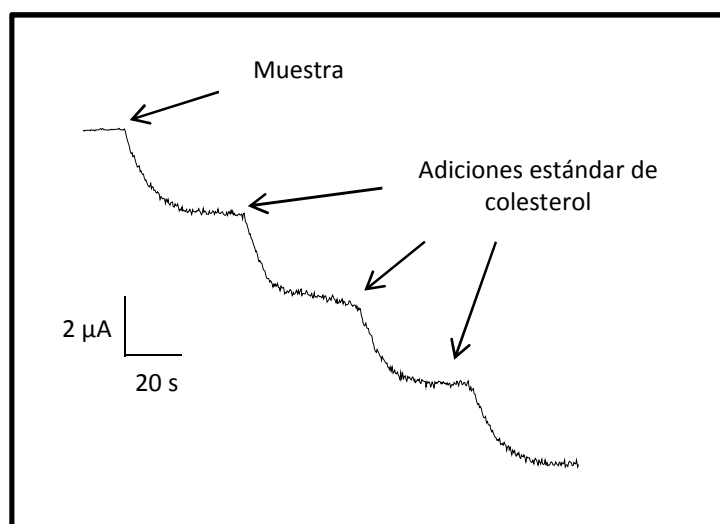


Figura 85. Amperograma obtenido con el biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE para adiciones sucesivas de colesterol 0.1 mM a la muestra de suero humano. $E_{ap} = -0.05$ V.

La pendiente obtenida realizando un calibrado externo, $(25.4 \pm 0.7) \mu\text{A mM}^{-1}$, no mostró diferencias significativas con la obtenida mediante adiciones estándar, $(24.8 \pm 0.9) \mu\text{A mM}^{-1}$, para un nivel de significación de 0.05, demostrando la ausencia de efecto matriz en este tipo de muestras cuando se emplea el biosensor desarrollado.

En la *Tabla 13* se muestran los valores de concentración de colesterol encontrados en las muestras de suero enriquecido, empleando el biosensor desarrollado, calculados como la media de cinco determinaciones. Los intervalos de confianza se calcularon para un valor de significación de 0.05, obteniéndose valores de RSD del 5.5, 4.3 y 3.3 para cada uno de los niveles de enriquecimiento ensayados.

Tabla 13. *Determinación de colesterol en muestras de suero humano enriquecido.*

ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE				
Muestra	Colesterol encontrado (mM)	RSD (%)	Colesterol adicionado (mM)	Recuperación (%)
1	2.0 ± 0.1	5.5	2.0	101 ± 5
2	5.0 ± 0.2	4.3	5.0	100 ± 4
3	7.2 ± 0.2	3.3	7.0	103 ± 3

Factor de dilución=50

Como en los biosensores anteriores, la validación de los resultados obtenidos se ha realizado empleando el ensayo de hipótesis utilizando el método test de la *t* de Student. Los valores de $t_{\text{Experimental}}$ obtenidos para los tres niveles de concentración son menores que el valor de t_{Tabulada} , por lo que se puede deducir que no hay diferencias significativas entre la concentración de colesterol adicionada y la recuperada a un nivel de significación de 0.05. Asimismo, en la Tabla se observan recuperaciones comprendidas entre (100 ± 4) % y (103 ± 3) %. Los resultados obtenidos demuestran el buen comportamiento del biosensor ChOx/HRP-GA-MNPs/PDDA/MWCNTs/GCE para la determinación de colesterol libre en muestras de suero sin necesidad de aplicar ningún tratamiento de la muestra salvo una dilución apropiada.

A partir de los resultados obtenidos y descritos en este Capítulo de esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- El “wrapping” de nanotubos de carbono con polielectrolitos como el poli(dialildimetilamonio) permite la inmovilización estable de nanopartículas de oro preservando las propiedades electrocatalíticas de los primeros. La plataforma electródica formada por nanopartículas de oro y nanotubos de carbono funcionalizados con poli(dialildimetilamonio) ha demostrado ser adecuada para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno, por lo que puede utilizarse para la construcción de biosensores basados en enzimas oxidasas. Este hecho se ha aprovechado para la construcción de un biosensor de colesterol oxidasa que presenta características analíticas adecuadas para la determinación de colesterol. Empleando la misma superficie, se ha puesto a punto un biosensor bienzimático basado en las enzimas colesterol oxidasa y peroxidasa para la determinación de colesterol con una selectividad mejorada con respecto a la del biosensor monoenzimático.
- La incorporación de nanopartículas magnéticas modificadas con glutaraldehído a la superficie de los nanotubos de carbono funcionalizados con poli(dialildimetilamonio) ha permitido construir un biosensor bienzimático para colesterol con características analíticas mejoradas con

respecto a las configuraciones anteriores. En este diseño se combina el efecto electrocatalítico ejercido por el nanomaterial modificado con la capacidad de las nanopartículas magnéticas para la inmovilización estable de las enzimas.

- Las buenas características analíticas obtenidas permiten aplicar los biosensores desarrollados a la determinación de colesterol en suero humano de forma rápida, sencilla y precisa.

- [Aqel, en prensa]: doi:10.1016/j.arabjc.2010.08.022.
- [Arya, 2008]: Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1083-1100.
- [Cai, 2001]: Cai H.; Xu C.; He P.; Fang Y. (2001) *Electroanal. Chem.* 510 (2001) 78-85.
- [Cao, 2009]: Cao, H.; He, J.; Deng, L.; Gao, X. *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 7974-7980.
- [Carralero, 2006]: Carralero, V.; Mena, M. L.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 730-736.
- [Cheng, 2009]: Cheng, Y. ; Liu, Y. ; Huang, J. ; Li, K. ; Xian, Y. ; Zhang, W. ; Jin, L. *Electrochim. Acta* 54 (2009) 2588-2594.
- [Correa-Duarte, 2006]: Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M. *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 22-25.
- [Dhand, 2008]: Dhand, C. ; Arya, S. K.; Datta, M. ; Malhotra, B. D. *Anal. Biochem.* 383 (2008) 194-199.
- [Eitan, 2003]: Eitan, A.; Jian, K.; Dukes, D.; Andrews, D.; Schadler, L. S. *Chem. Mater.* 15 (2003) 3198-3201.
- [Gopalan, 2009]: Gopalan, A. I.; Lee, K. P.; Ragupathy, D. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2211-2217.

- **[Guo, 2004]:** Guo, M.; Chen, J.; Li, J.; Nie, L.; Yao, S. *Electroanalysis* 16 (2004) 1992-1998.
- **[Gupta, 2005]:** Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.
- **[Haddad, 2009]:** Haddad, R.; Cosnier, S.; Maaref, A.; Holzinger, M. *Sens. Lett.* 7 (2009) 801-805.
- **[Hong, 2007]:** Hong, R.; Li, J.; Wang, J.; Li, H. *China Particuology* 5 (2007) 186-191.
- **[Kouassi, 2005]:** Kouassi, G. K.; Irudayaraj, J.; McCarty, G. J. *Nanobiotechnol.* 3 (2005) 1-9.
- **[Li, 2005]_a:** Li, G.; Liao, J. M.; Hu, Q.; Ma, N. Z.; Wu, P. J. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2140-2144.
- **[Li, 2005]_b:** Li, J.; Yu, Q.; Peng, T. *Anal. Sci.* 21 (2005) 377-381.
- **[Li, 2009]:** Li, J.; Wei, X.; Yuan, Y. *Sens. Actuators B: Chem.* 139 (2009) 400-406.
- **[Li, 2010]:** Li, D.; Teoh, W. Y.; Gooding, J. J.; Selomulya, C.; Amal, R. *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 1767-1777.
- **[Lu, 2007]_a:** Lu, A.; Salabas, E. L.; Schuth, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 1222-1244.
- **[Manjunatha, 2011]:** Manjunatha, R.; Nagaraju, D. H.; Suresh, G. S.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F.; Venkatesha, T. V. *J. Electroanal. Chem.* 651 (2011) 24-29.
- **[Manso, 2007]:** Manso, J.; Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *J. Electroanal. Chem.* 603 (2007) 1-7.
- **[Özer, 2007]:** Özer, B. C.; Özyörük, H.; Çelebi, S. S.; Yıldız, A. *Enzym. Microb. Technol.* 40 (2007) 262-265.
- **[Pingarrón, 2008]:** Pingarrón, J.M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. *Electrochim. Acta* 53 (2008) 5848-5866.
- **[Qu, 2007]:** Qu, S.; Wang, J.; Kong, J.; Yang, P.; Chen, G. *Talanta* 71 (2007) 1096-1102.
- **[Sathe, 2006]:** Sathe, T. R.; Agrawal, A.; Nie, S. *Anal. Chem.* 78 (2006) 5627-5632.
- **[Singh, 2004]:** Singh, S.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Anal. Chim. Acta*, 502 (2004) 229-234.

- **[Sun, 2011]**: Sun, Y.; Yang, H.; Wang, W. *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 2049-2055.
- **[Tan, 2005]**: Tan, X.; Li, M.; Cai, P.; Luo, L.; Zou, X. *Anal. Biochem.* 337 (2005) 111-120.
- **[Tsai, 2008]**: Tsai, Y. C.; Chen, S. Y.; Lee, C. A. *Sens. Actuators B: Chem.* 135 (2008) 96-101.
- **[Vairavapandian, 2008]**: Vairavapandian, D.; Vichchulada, P.; Lay, M. D. *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 119-129.
- **[Wang, 1999]**: Wang, H. Y.; Mu, S. L. *Sens. Actuators B: Chem.* 56 (1999) 22-30.
- **[Wang, 2006]_b**: Wang L.; Bai J.; Huang P.; Wang H.; Zhang L.; Zhao Y. *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1825-1829.
- **[Wisitsoraat, 2009]**: Wisitsoraat, A.; Karuwan, C.; Wong, K.; Phokharatkul, D.; Sritongkham, P.; Tuantranont, A. *Sensors* 9 (2009) 8658-8668.
- **[Yang, 2006]_a**: Yang, M.; Yang, Y.; Yang, H.; Shen, G.; Yu, R. *Biomaterials* 27 (2006) 246-255.
- **[Yang, 2006]_b**: Yang, M.; Yang, Y.; Qu F.; Lu, Y.; Shen, G.; Yu, R. *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 211-217.
- **[Yang, 2009]_b**: Yang, Y.; Yang, G.; Huang, Y.; Bai, H.; Lu, X. *Colloid. Surf. A* 340 (2009) 50-55.
- **[Yáñez-Sedeño, 2010]**: Yáñez-Sedeño, P.; Riu, J.; Pingarrón, J. M.; Rius, F. X. *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 939-953.
- **[Zhang, 2007]_b**: Zhang, Y.; Zeng, G. M.; Tang, L.; Huang, D. L.; Jiang, X. Y.; Chen, Y. N. *Biosens Bioelectron.* 22 (2007) 2121-2126.

**IV. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES
AMPEROMÉTRICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA
EN SUERO HUMANO**

La testosterona (17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona) (Figura 86) es una hormona esteroidea con potentes propiedades androgénicas, que juega un papel de gran importancia en procesos como la diferenciación sexual masculina, la síntesis de proteínas y el rendimiento físico en los humanos [Chen, 2009]_b. Esta hormona presenta una estructura derivada del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno, hidrocarburo policíclico que se puede considerar un producto de la saturación del fenantreno asociado a un anillo de ciclopentano. Posee 17 átomos de carbono y de él se derivan los esteroides, que constituyen el núcleo base para multitud de moléculas de origen lipídico, como los esteroides (colesterol), ácidos biliares y hormonas esteroideas.

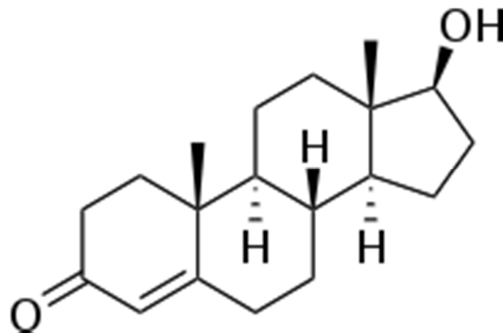


Figura 86. Estructura química de la testosterona.

Este y otros esteroides anabolizantes androgénicos (AAS) han sido empleados por algunos deportistas desde los años 50 como sustancias dopantes para el aumento de su masa muscular. La Agencia Mundial Antidopaje (AMA) (WADA en la terminología anglosajona) prohibió su uso para asegurar el "fair play" y proteger a los atletas de posibles efectos colaterales adversos [Houtman, 2009]. Debido a la necesidad de determinar estas sustancias a los bajos niveles de concentración requeridos, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos cromatográficos, la mayoría con detección por espectrometría de masas. Entre ellos, los métodos utilizados para la determinación de testosterona han sido aplicados al análisis de fluidos biológicos alcanzándose buenos niveles de selectividad y sensibilidad [Li, 2002; Leinone, 2004; Saudan, 2004]. No obstante, estos procedimientos presentan el inconveniente de requerir instrumentación costosa y necesitar elevados tiempos entre la etapa de

muestreo y la obtención de resultados, lo cual limita su uso en los análisis de rutina [Lu, 2007]_b.

Los inmunosensores electroquímicos constituyen una excelente alternativa para la determinación de testosterona en muestras biológicas. Los anticuerpos proporcionan la especificidad necesaria para este tipo de análisis, mientras que el procedimiento de medida electroquímica permite una alta sensibilidad en la detección, obteniéndose los resultados de forma sencilla y en tiempo real. Por otra parte, estos métodos se caracterizan por el bajo coste de la instrumentación y su mantenimiento, así como el de la fabricación de los biosensores.

Uno de los aspectos fundamentales en la preparación de un inmunosensor electroquímico es la necesidad de inmovilización estable y orientada del inmunorreactivo sobre la superficie del electrodo sin que tenga lugar la pérdida de su actividad biológica. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan desarrollado distintas estrategias y materiales de inmovilización, con el fin de lograr cada vez mejores configuraciones.

En este Capítulo se describe la puesta a punto de dos tipos de inmunosensores para la determinación de testosterona. El primer diseño está basado en un electrodo compuesto de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro. El segundo es un magnetoinmunosensor preparado con micropartículas magnéticas modificadas con proteína A y electrodos serigrafados desechables. En ambos casos se optimizaron las variables experimentales que afectan tanto a la modificación de la superficie electródica como a las respuestas amperométricas y al funcionamiento del inmunosensor. Asimismo, se evaluaron las características analíticas de los métodos desarrollados, así como su selectividad y diferentes aspectos relacionados con la estabilidad de los inmunosensores. Finalmente la utilidad analítica de éstos se demostró por aplicación a la determinación de testosterona en muestras de suero humano.

A continuación se describen los aspectos más relevantes de cada uno de estos diseños de inmunosensores para la determinación de testosterona.

INMUNOSENSOR DE TESTOSTERONA BASADO EN UN ELECTRODO COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO

1

El electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/teflón combina las propiedades únicas de las nanopartículas de oro, como son la inmovilización estable de biomoléculas sin pérdida de actividad biológica y la mejora de la cinética de la transferencia electrónica, con las extraordinarias propiedades electrocatalíticas que poseen los nanotubos de carbono. El empleo de electrodos compósitos ofrece importantes ventajas en comparación con los electrodos convencionales formados por una sola fase conductora, ya que pueden fabricarse con una gran flexibilidad en lo que se refiere a su forma y tamaño, presentando además una mayor relación señal/ruido y una superficie fácilmente renovable por pulido. Junto a éstas, una ventaja añadida es que, al tratarse de una matriz tridimensional, las nanopartículas de oro se pueden incorporar a la misma por simple inclusión física. De este modo, al no existir ningún tipo de unión covalente a la pared de los nanotubos, no se altera su estructura, pero el material mixto resultante exhibe nuevas y mejores propiedades, apreciándose un efecto sinérgico debido a la presencia de ambos componentes, así como una mejora en el tiempo de vida útil del bioelectrodo [Manso, 2007]. Como ejemplo ilustrativo de esta mejora, en la *Figura 87* se muestran algunas señales amperométricas para la oxidación del peróxido de hidrógeno obtenidas con distintos electrodos compósitos, observándose cómo la mezcla de nanotubos, nanopartículas de oro y teflón proporciona corrientes mucho más intensas.

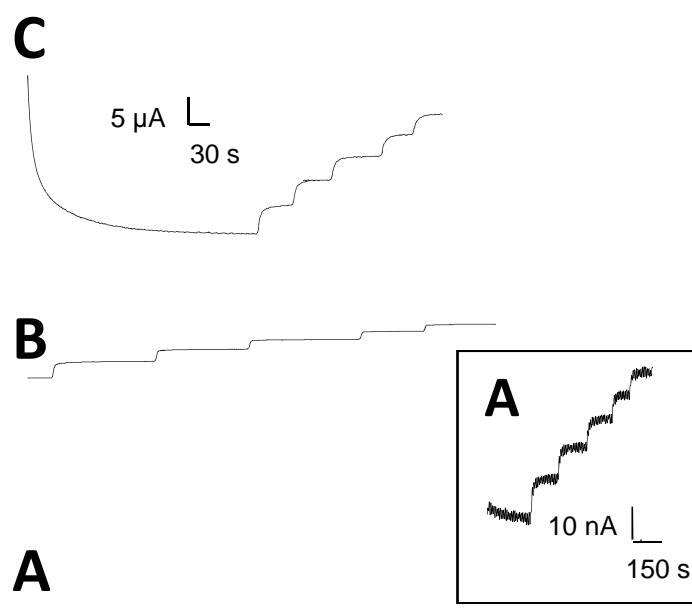


Figura 87. Señales amperométricas obtenidas por adiciones sucesivas de H_2O_2 1 mM sobre un electrodo de grafito-teflón (A), un electrodo de nanotubos de carbono-teflón (B) y un electrodo de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y teflón (C). Medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.05 M de pH 7.4; $E_{ap} = +0.5$ V. [Manso, 2007].

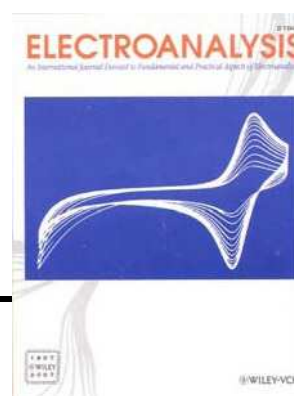
Por lo comentado anteriormente, estos electrodos compósitos suponen una estrategia sencilla, rápida y barata para la producción de bioelectrodos. Un ejemplo es el que se presenta en este trabajo. Se trata de un inmunosensor electroquímico de tipo competitivo para la determinación de testosterona que utiliza la peroxidasa como marcador enzimático, catecol como mediador redox y H_2O_2 como sustrato de la enzima. Este inmunosensor se basa en un electrodo compósito de nanotubos de carbono, oro coloidal y teflón, en el que el anticuerpo se inmoviliza directamente sobre las nanopartículas de oro. Este tipo de inmovilización se produce gracias a la fuerte interacción que tiene lugar entre estas partículas y los grupos $-\text{SH}$ y $-\text{NH}_2$ de las biomoléculas [Carralero, 2007; Cui, 2008], que es mucho más intensa que las interacciones π - π de las biomoléculas con los nanotubos de carbono.

A continuación se muestra la publicación resultante de este trabajo para, posteriormente, comentar sus aspectos más relevantes, así como aquellos estudios que no se incluyeron en el artículo.

An Electrochemical Immunosensor for Testosterone Using Gold Nanoparticles – Carbon Nanotubes Composite Electrodes

Verónica Serafín, Marcos Eguílaz, Lourdes Agüí, Paloma Yáñez-Sedeño,
José M. Pingarrón

Electroanalysis



Vol. 23 pp. 169-176, 2011

An Electrochemical Immunosensor for Testosterone Using Gold Nanoparticles – Carbon Nanotubes Composite Electrodes

V. Serafin, M. Eguilaz, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño,* J. M. Pingarrón

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

tel: +34 91 394 4317; fax: +34 91 394 4329

*e-mail: yseo@quim.ucm.es

Received: July 12, 2010

Accepted: August 24, 2010

Abstract

A novel electrochemical immunosensor for testosterone based on direct attachment of antitestosterone on hybrid gold nanoparticles/carbon nanotubes-Teflon composite electrodes is reported. This material combined the ability of gold nanoparticles for biomolecules immobilization retaining their biological activity with synergic electrocatalytic effect demonstrated by coupling gold nanoparticles and carbon nanotubes. Competitive assay between testosterone and HRP- testosterone for binding sites of antibodies was employed. Amperometry at -0.05 V vs. Ag/AgCl was used to monitor affinity reaction upon addition of H_2O_2 with catechol as redox mediator. Calibration plot was linear between 0.1 and 10 ng/mL testosterone. *LOD* value was 85 ± 6 pg/mL. Good results were obtained in the application to spiked human serum.

Keywords: Electrochemical immunosensor, Gold nanoparticles, Composite electrodes, Testosterone

DOI: 10.1002/elan.201000419

Presented at the 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2010, Gijón, Spain

1 Introduction

Electrochemical immunosensors integrate selectivity of the antibody-antigen recognition processes with the excellent capabilities of electrochemical transduction related to sensitivity, low cost, speed of analysis and possibility of portable screening. A key aspect to be considered in immunosensors preparation is the efficient immobilization of immunoactive compounds on the electrode surface avoiding significant losses of their bioactivity and improving stability. Recently, nanomaterials have demonstrated their usefulness for this purpose, improving also important electroanalytical characteristics concerning low-background currents, high signal-to-noise ratio and fast electron transfer [1]. Among the different types of nanomaterials, gold nanoparticles (nAu) have shown to be a useful tool for the development of electrochemical immunosensors. Various configurations based on the immobilization of immunoreagents on gold nanoparticles have been reported in the last years. An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen was constructed by forming a toluidine blue/poly-sulfanilic acid interface containing amine groups to assemble nAu on a glassy carbon electrode for immobilization of carcinoembryonic antibody and peroxidase [2]. A reagentless immunosensor for the determination of carbohydrate 19-9, based on the immobilization of antibody in colloidal gold nanoparticle-modified carbon paste electrodes and the direct electro-

chemistry of horseradish peroxidase labeled to the CA19-9 antibody, was reported [3]. A carbon paste electrode consisting of room temperature ionic liquid and graphite, whose surface was modified with nAu, was employed to construct an electrochemical biosensor for α -fetoprotein [4]. Electrochemical immunosensors for the determination of carcinoma antigen 125 were developed by immobilizing CA125 antibody on nAu and thionine-modified carbon paste [5], and the CA125 antigen on colloidal nAu stabilized with a cellulose acetate membrane on a glassy carbon electrode [6]. nAu and methylene blue were assembled layer-by-layer on a glassy carbon electrode modified with thiourea for the detection of human chorionic gonadotrophin [7].

Furthermore, various immunosensors have been designed making use of hybrid materials such as sol-gel and/or self-assembled monolayers and nAu, exhibiting high sensitivity and long-term stability [8,9]. A sensitive amperometric immunosensor for α -fetoprotein using carbon nanotubes (CNTs)/nAu hybrid-doped chitosan film was recently reported [10]. Amperometric immunosensors for the quantification of progesterone were developed combining the well known properties of nAu for the immobilization of biomolecules with the characteristics of graphite-Teflon composite electrodes, the experimental approach implying the direct attachment of the antiprogestosterone antibody to the electrode surface [11,12].

On the other hand, testosterone (17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one) is a steroid hormone with potent androgenic properties and strong anabolic effects [1]. The use of androgenic steroids to improve athletic performance was banned by the International Olympic Committee (IOC) and other international sports associations (IAAF) since 1974 [13]. Consequently, rigorous screening procedures are necessary to detect the illegal administration of such compounds. Various electrochemical immunosensors and immunoassays have been reported for the determination of testosterone. A recombinant Fab fragment-based electrochemical immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine was developed [14]. The sensor comprised of a testosterone conjugate on the surface of screen-printed electrodes, and recognition followed by an antitestosterone Fab fragment. The use of an IgG-horse-radish peroxidase conjugate determined the degree of competition. An electrochemical immunoassay based on encapsulating testosterone antibody into polyvinyl butyral sol-gel film doped with gold nanowires and using potentiometric detection was also reported [15]. Also, an immunochromatographic assay using a nitrocellulose membrane was combined with electrochemical detection using an electrode chip for the determination of testosterone [16]. Competitive immunoreactions on the membrane were performed by making flow a testosterone solution containing HRP-labeled testosterone. Ferrocenemethanol and H₂O₂ were employed to obtain the electrochemical signals.

In this paper, a novel and sensitive electrochemical immunosensor for the determination of testosterone is reported. The approach combines the use of nAu and CNTs-Teflon composite electrodes with the direct attachment of antitestosterone to the electrode surface. The hybrid material demonstrated to be an excellent electrode substrate for the preparation of biosensors [17,18]. It combines the unique properties of gold nanoparticles concerning immobilization of biomolecules retaining their biological activity and as efficient conducting interfaces producing enhanced electrode kinetics, with the well known electrocatalytic activity of CNTs. This coupling produces a synergic effect in the electroanalytical performance of the resulting electrode material that can be profited for the development of electrochemical biosensors. A relevant advantage is that nAu can be incorporated into the CNTs-Teflon matrix by simple physical inclusion, thus making the electrode fabrication procedure easy, fast and cheap, and producing bioelectrodes easily renewable by polishing. Furthermore, nAu act as isolated zones for biomolecules adsorption surrounded by conductive CNTs/Teflon composite. This fact makes the preparation of immunosensors easier with respect to the designs using metallic gold electrodes, and allows a facile and strict control of the immunoreagents immobilization conditions.

2 Experimental

2.1 Reagents and Solutions

30 μ g/mL and 15 μ g/mL solutions of monoclonal murine antitestosterone (East Coast Bio, USA) were prepared by suitable dilution with 0.1 M phosphate buffer solution 0.1 M KCl of pH 7.4 (PBS). Polyclonal sheep antitestosterone (Abcam, UK) was also used. In this case, solutions were prepared by 1/10 and 1/100 dilutions with PBS. Testosterone labeled with peroxidase (testosterone-HRP) was obtained from Biospecific, USA, and 10 μ g/mL and 1 μ g/mL solutions were prepared by dilution with PBS. A stock 100 μ g/mL solution of testosterone (4-androsten-17 β -ol-3-one) from Aldrich (98%) was prepared in ethanol, and stored at 4°C. More diluted solutions were prepared by dilution with PBS. 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Merck, 97%) solutions were prepared in PBS buffer. 5 mM catechol solutions (Fluka, >98%), and 0.5 M hydrogen peroxide solutions (Scharlau, 99%) in PBS were also used. For the cross-reactivity assays, 17 α -metilttestosterone, epitestosterone (4-androsten-17 α -ol-3-one), 19-nortestosterone (nandrolone), and β -estradiol, all from Sigma or Aldrich, were tested. Gold colloid (20 nm diameter, Sigma), multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) (30 \pm 15 nm diameter) with 95% purity (NanoLab, Brighton, MA) and Teflon powder (Aldrich) were used for the preparation of the composite nanostructured electrode.

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

The electrochemical measurements were carried out using an Epsilon Multichannel detector from BAS. A three-electrode cell (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, were used. All electrochemical experiments were performed at room temperature.

2.3 Procedures

2.3.1 Preparation of Gold Nanoparticles-Carbon Nanotubes-Teflon Composite Electrodes (nAu/MWCNTs/Teflon)

The composite electrode was fabricated by a modification of a previously described procedure [18]. In brief, 50 mg of MWCNTs and 90 μ L of the colloidal gold dispersion were thoroughly hand mixed for 10 min and water was evaporated under N₂ current. Then, 50 mg of Teflon were added and thoroughly hand mixed until complete homogenization. Portions of the resulting mixture were packed into Teflon holders (3 mm inner diameter) and pressed

tightly. The electrical contact was made through a stainless steel screw.

2.3.2 Immunosensor Preparation

A 10- μL aliquot of the 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ monoclonal antitestosterone solution was deposited on the nAu/MWCNTs/Teflon electrode surface and incubated for 30 min at 37°C in a humid environment. Then, the modified electrode was washed with 0.1 M PBS of pH 7.4 and left to dry. A blocking step of the remaining electrode surface was accomplished by immersion in a 1% (w/w) BSA solution for 30 minutes at 37°C, and washed carefully with 0.1 M PBS of pH 7.4.

2.3.3 Testosterone Determination

The immuno-electrochemical determination of testosterone was carried out by depositing 10 μL of a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone-HRP solution which also contained the target testosterone, on the immunosensor surface. After incubation at 37°C for 30 min, the immunosensor with the immunoconjugate layer was washed with PBS solution of pH 7.4 and dried at ambient temperature under darkness. Then, the immunosensor was immersed into the electrochemical cell containing 5 mL of a 0.5 mM catechol solution prepared in PBS of pH 7.4. Amperometry under continuous stirring was performed by adding 50 μL of 0.5 M hydrogen peroxide solution to the cell, the reduction current from the catechol oxidation product being measured at -0.05 V vs. Ag/AgCl.

2.3.4 Determination of Testosterone in Serum Samples

Analyzed samples were lyophilized human serum (Sigma) spiked with testosterone at the 2.5 ng/mL concentration level. Serum samples were stored at -20°C . When used, 75 μL of the spiked serum were diluted to a volume of 100 μL with 0.1 M PBS of pH 7.4. The determination of testosterone was performed by adding a 5- μL aliquot of the diluted sample solution to the testosterone-HRP solution with a final volume of 25 μL .

Then, a 10- μL aliquot of this mixture solution was deposited on the electrode surface and the procedure described in Section 2.3.3 was followed. Amperometric measurements were made at a potential of -0.05 V .

3 Results and Discussion

The fundamentals of the developed immunosensor are illustrated in Figure 1. The attachment of antibodies to the electrode surface is proposed to be carried out by direct interaction of the biomolecules with nAu. This type of immobilization has been claimed due to the strong interaction between nAu and mercapto or primary amine groups in biomolecules [11,19]. It should be remarked that this is much stronger than the possible π - π interaction between proteins and carbon nanotubes.

Antibodies were directly attached to the electrode surface through the interaction of the biomolecules with nAu [11]. A competitive assay between testosterone and HRP-labeled testosterone for the binding sites of the immobilized antibody was accomplished.

Various redox mediators for peroxidase, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ferrocyanide, hydroquinone and catechol, were checked by evaluating their amperometric

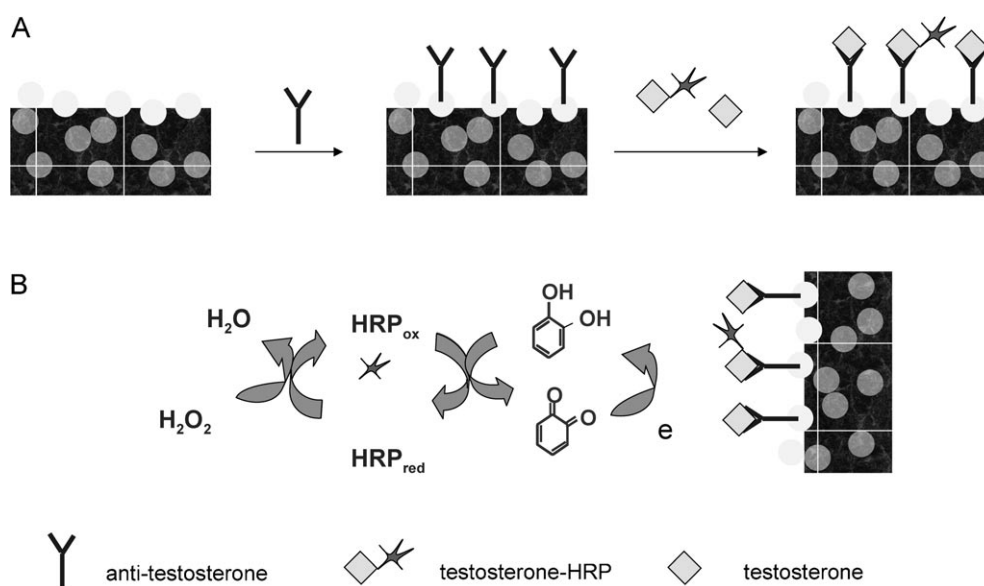


Fig. 1. Schematic display of the fundamentals of the electrochemical testosterone immunosensor using nAu/MWCNTs/Teflon electrodes.

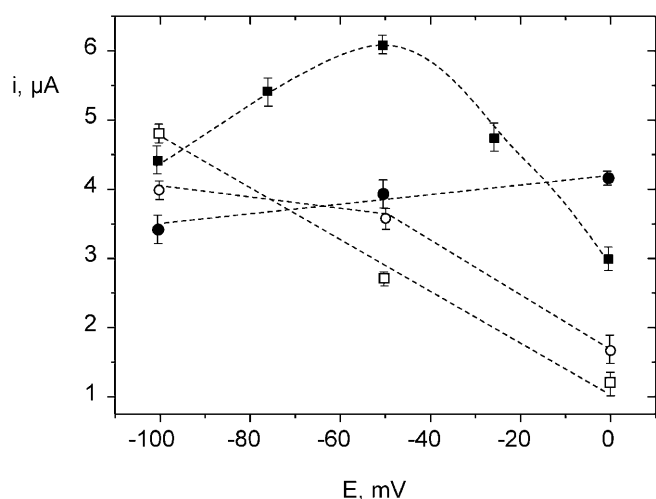


Fig. 2. Amperometric responses measured at IgG-HRP/nAu/MWCNTs/Teflon immunosensors upon addition of 0.5 mM H_2O_2 in the presence of 0.5 mM (■) catechol; (●) hydroquinone; (○) ferrocyanide; (□) TMB. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG-HRP; 0.1 M PBS, pH 7.4. Mean values of three measurements.

responses at nAu/MWCNTs/Teflon electrodes in the -0.1 to 0.0 V vs. Ag/AgCl potential range, upon addition of 0.5 mM hydrogen peroxide to the electrochemical cell containing 5 mL of a 0.5 mM mediator solution prepared in PBS. A model immunosensor prepared by immobilization of IgG-HRP on the nAu/MWCNTs/Teflon electrode was used for this purpose. Figure 2 shows that the best sensitivity was achieved using catechol as mediator (the response stability was also found to be better) and -0.05 V as the detection potential. Accordingly, these variables were selected for further work. At this potential value, the direct reduction of 5 mM H_2O_2 at an unmodified nAu/MWCNTs/Teflon electrode produced a current that was only approximately 5% than that obtained at the electrode prepared with IgG-HRP in the presence of 5 mM catechol. Therefore, that nonspecific signal can be considered as negligible under the selected conditions. Moreover, the amperometric response for H_2O_2 at the IgG-HRP/nAu/MWCNTs/Teflon with no mediator in solution was also more than 10 times lower than in the presence of catechol.

3.1 Optimization of the Experimental Variables Involved in the Immunosensor Performance

MWCNTs-Teflon composite pellets containing 50% Teflon were employed as electrode matrices as they demonstrated suitable mechanic and conducting properties [18]. The colloidal gold loading incorporated into these pellets was optimized by testing the amperometric response of model immunosensors prepared by immobilization of IgG-HRP on the nAu/MWCNTs/Teflon electrode. 5 mM hydrogen peroxide were added to the electrochemical cell containing 5 mL of a 1 mM catechol solution in PBS, and the steady-state current was measured at

-0.05 V. The amperometric response increased with the colloidal gold dispersion loading up to 90 μL , reflecting improved electron transfer kinetics in the presence of nAu. The steady-state current leveled off between 90 and 140 μL and a decrease in the measured current was observed for larger loadings, as a consequence of the increase in the resistance and double layer capacitance of the modified electrode produced by a lower ratio of carbon sensing sites in the electrode material [20]. A similar behavior was reported for other colloidal gold-modified carbon paste electrodes [11,21]. According to the obtained results, a 90- μL aliquot of the colloidal gold dispersion was selected to prepare the composite nanostructured electrode matrix.

The influence of the hydrogen peroxide concentration added to the working solution was checked by depositing 10 μL of a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone-HRP solution onto the optimized nAu/MWCNTs/Teflon electrode. The steady-state current rapidly increased with the substrate concentrations and tended to level off from 1 mM H_2O_2 . In order to guarantee that the enzyme reaction rate depended only on the enzyme loading, 5 mM H_2O_2 was selected as the substrate concentration for further work. A similar optimization concerning the mediator concentration led us to select 0.5 mM catechol.

The amount of antibody immobilized onto the electrode surface plays a key role in the linear range and sensitivity that can be achieved with the immunosensor. The effect of the antitestosterone loading on the immunosensor response was evaluated by constructing different immunosensors prepared as described in Section 2.3.2 using 10 μL of different monoclonal antitestosterone solutions in the 0 to 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration range. The amperometric measurements were carried out with no testosterone and depositing 10 μL of a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone-HRP solution. The steady-state current increased with the Ab loading up to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (results not shown) indicating that low antibody loadings were not enough to bind the HRP-labeled antigen. The response leveled off for larger loadings. As it has been reported previously [11], the antibody concentration at which the highest amperometric response was reached is probably related with saturation of the gold nanoparticles adsorbing sites. According to these results, a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ monoclonal antitestosterone concentration was selected to construct the immunosensor.

After the antibody immobilization, BSA was employed to minimize nonspecific adsorption. The effect on the amperometric response of the protein concentration and the immersion time in the BSA solution were checked over the 0.5–3% (w/v) and 15–60 min ranges, respectively. Two sets of experiments were carried out. One set implied deposition of 10 μL of the 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone-HRP solution without testosterone, and another, the deposition of the same volume of the testosterone-HRP solution but also containing 0.7 ng/mL testosterone. As expected, in the absence of testosterone, where no competition between testosterone and testosterone-HRP occurred, the

measured current decreased as the immersion time and BSA concentration increased, as a result of a higher electrode blocking. However, in the presence of testosterone, the current was practically unaffected by the immersion time. Concerning the BSA concentration, the higher immunosensor response was observed with the lower value tested (0.5%). It decreased notably for 1% BSA and leveled off for larger concentrations. According to these results, and considering the largest difference between the measurements carried out in the absence and in the presence of testosterone as the selection criterion (a highest initial current can be obtained in this way and consequently a higher sensitivity can be achieved), 1% BSA and an immersion time of 30 min were selected.

Moreover, as indicated in Section 2, incubations steps were carried out at 37°C according to literature recommendations [1, 14].

In order to optimize the competitive assay, the amperometric responses obtained with immunosensors incubated with 0.5, 1 and 2 µg/mL testosterone-HRP conjugate for different testosterone concentrations were compared. Figure 3 shows that the current increased notably by using 1 µg/mL instead of 0.5 µg/mL conjugate. However, no further current increase was gained for low testosterone concentrations when a 2 µg/mL testosterone-HRP concentration was employed, this value probably corresponding to the over-saturation of the immobilized antibodies. Furthermore, Figure 3 also displays a shift to the left of the corresponding curves as the testosterone-HRP concentration was lower. This behavior implied a decrease in the EC_{50} and the detection limit values when a low conjugate concentration was employed. However, this Figure shows clearly that the difference between the highest measured signal (in the absence of testosterone or at very low testosterone concentrations) and the signal re-

corded for high testosterone concentrations decreased as the conjugate loading was lower. Obviously, the measured current as well as the corresponding Hill slope values increased for higher testosterone-HRP concentrations. All these results led us to select a 1 µg/mL testosterone-HRP concentration to evaluate the analytical performance of the immunosensors. Finally, the incubation time for the immunoassay was also optimized over the 15 to 60 min range. The steady-state current increased sharply up to 30 min and then it leveled off; therefore 30 min was selected as the incubation time to be used.

3.2 Analytical Performance of the Immunosensor

Under the optimized conditions specified above, a calibration graph for testosterone was constructed over the 10^{-3} – 10^3 ng/mL concentration range (Figure 4). The range of linearity ($r=0.993$) extended between 0.1 and 10 ng/mL, which is a useful range for the analysis of testosterone in real samples [22]. The blank signal corresponding to the measurement carried out with the electrode constructed without testosterone-HRP is also displayed in Figure 4 as the (▲) symbol. The blank signal mean value ($n=5$) was 0.05 µA which is approximately 6% of the highest recorded signal.

The calibration curve was fitted by nonlinear regression to the equation:

$$y = [(i_{\max} - i_{\min}) / (1 + EC_{50}/x)] + i_{\min}$$

($r=0.996$), where i_{\max} and i_{\min} are the maximum and minimum current values in the calibration curve, 0.85 ± 0.02 µA and 0.05 ± 0.04 µA, respectively. The EC_{50} value, concentration at which 50% competition occurred, was 1.0 ± 0.2 ng/mL, and the Hill slope value (h) obtained was -1.2 ± 0.2 . The limit of detection was calculated from the equation [3]:

$$LOD = EC_{50} [(i_{\max} - i_{\min}) / (i_{\max} - i_{\min} - 3s)]^{-1/h}$$

where s is the standard deviation of the zero value (the steady state current measured in the absence of testosterone), $s = \pm 0.02$ µA ($n=10$), with a relative standard deviation (RSD) of 2.4%. By substitution of the calculated parameters, a LOD of 85 ± 6 pg/mL testosterone was obtained, which is similar to that reported (90 ± 13 pg/mL) by immobilizing testosterone-BSA conjugate on screen-printed carbon electrodes and recognition based on anti-testosterone Fab fragment [14].

The reproducibility of the measurements performed with the immunosensor was checked in two different ways. Firstly, different immunosensors were prepared using the same nAu/MWCNTs/Teflon electrode, and different testosterone concentrations: 0.05, 0.5 and 100 ng/mL, were measured. The RSD values obtained ($n=10$) were 2.6%, 3.5% and 6.4%, respectively. Also, these testosterone concentrations were measured with nine immunosensors prepared using different nanostructured elec-

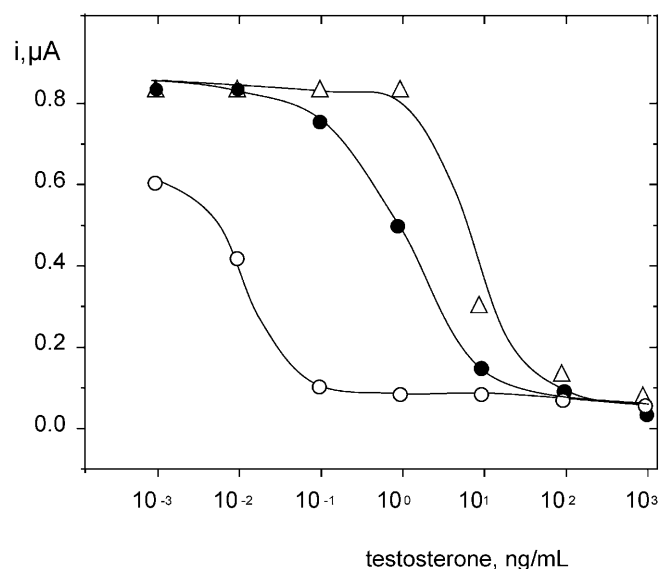


Fig. 3. Amperometric responses as a function of testosterone concentration recorded with immunosensors incubated with (○) 0.5; (●) 1 and (△) 2 µg/mL testosterone-HRP conjugate.

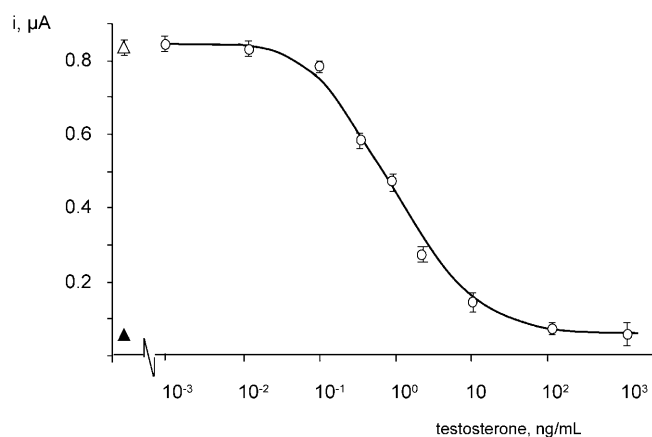


Fig. 4. Calibration graph for testosterone obtained with the antitestosterone/nAu/MWCNTs/Teflon immunosensor; $E_{\text{app}} = -0.05$ V; (Δ) amperometric response obtained without testosterone; (\blacktriangle) blank signal measured without testosterone-HRP.

trodes. In this case, *RSD* values were 2.8%, 4.6% and 8.2%, indicating a quite good reproducibility of the amperometric measurements made with the immunosensors, which confirmed also the good reproducibility achieved in the fabrication procedure.

Another test was the evaluation of the immunosensors lifetime. A set of different immunosensors were prepared and stored under dry conditions at 4 °C until their use. Amperometric measurements of a solution prepared in the absence of testosterone were performed daily. The steady-state current measured with the immunosensor after one day of storage was approximately 10% lower than that recorded just after the bioelectrodes preparation. However, the responses remained inside the range set by $\pm 3 \times$ the standard deviation of the measurements carried out during the first day, for the next 7 days. After the 8th day, the measured current decreased up to a 70%

of that obtained the first day of preparation. This good stability with respect to other testosterone immunosensor designs [14] can be attributed to the demonstrated capability of gold nanoparticles to adsorb proteins retaining their biological activity. After the mentioned useful lifetime, the preparation of a new immunosensor was extremely simple, involving only polishing of the bioelectrode on a 150 grit SiC paper for 5 s to obtain a fresh nAu/MWCNTs/Teflon surface onto which the antibody can be deposited again.

3.3 Interferences

Various compounds closely related with testosterone have been tested as potential interferents against the immunosensor response to testosterone. The considered species, epitestosterone, β -estradiol, 19-nortestosterone and 17 α -methyl testosterone, are all of them steroid hormones with close structural similarities with testosterone (Figure 5). The experiments were performed by measuring the amperometric responses obtained with the developed immunosensors by depositing 10 μL of a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone-HRP solution containing the potential interferent instead of testosterone. The experiments were carried out with both monoclonal and polyclonal antitestosterone antibodies for comparison. Figure 6 shows that, as expected, monoclonal antibodies exhibited a higher specificity, with a low cross-reactivity for epitestosterone, β -estradiol and 17 α -methyl testosterone. The highest interference, practically independent on the type of antibody used, was that produced by 19-nortestosterone. This is reasonable considering that this compound differs from testosterone only in the methyl group at the C-19 position, with identical D rings for both steroids (see Figure 5). It is worth to note that testosterone epimer, α -testosterone, only differs from testosterone in the hydroxy group orientation at the C-17 position. Despite that, a

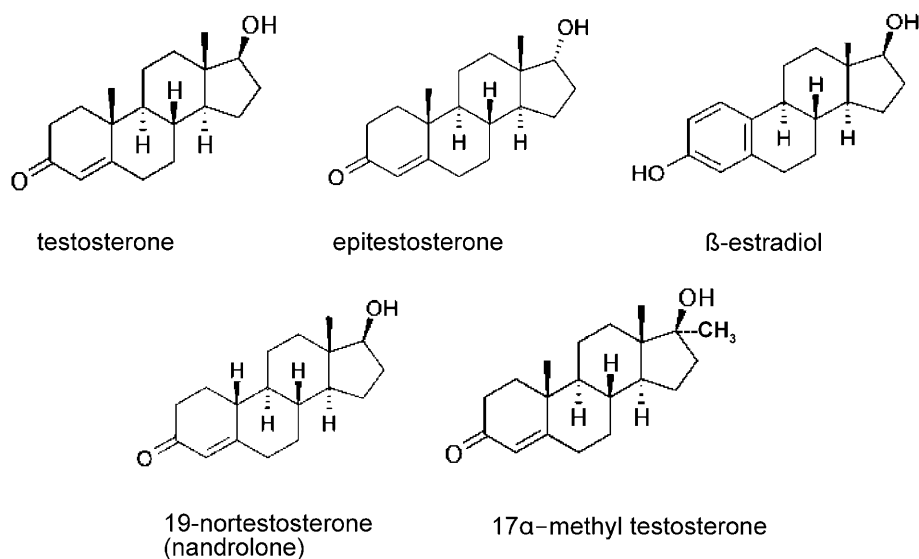


Fig. 5. Chemical structures for testosterone and related steroid hormones.

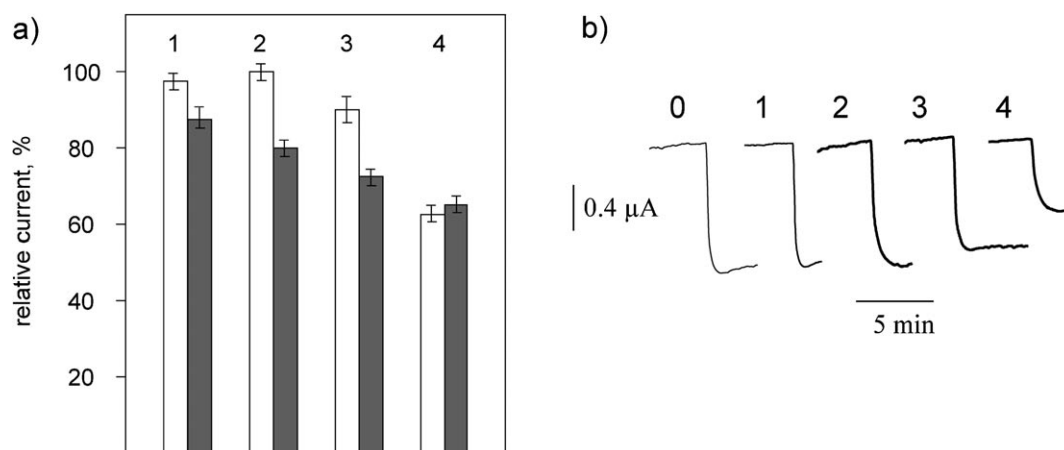


Fig. 6. Cross-reactivity at the antitestosterone-nAu/MWCNTs/Teflon electrochemical immunosensor; a) Relative responses to testosterone in the presence of 1 µg/mL potential interferent using monoclonal (white bars) or polyclonal (dark bars) antibodies; b) amperometric signals recorded using the monoclonal antibody for: 0, no steroid hormone present; 1, epitestosterone; 2, β-estradiol; 3, 19-nortestosterone; 4, 17α-methyl testosterone.

very good selectivity of the immunosensor was found, especially when the monoclonal antibodies were used.

3.4 Determination of Testosterone in Human Serum

The antitestosterone-nAu/MWCNTs/Teflon immunosensor was applied to the determination of testosterone in spiked human serum. The possibility of a matrix effect was evaluated by measuring a set of unspiked samples diluted with different volumes of PBS containing 1 µg/mL testosterone-HRP conjugate. It was observed that when 75 µL of serum were diluted up to a final volume of 100 µL, the matrix effect was negligible. The characteristics of the calibration plot for diluted serum samples were similar to those of the calibration graph for testosterone standard solutions, and, so, a Hill slope value, h , of 1.0 ± 0.2 was obtained. This demonstrated that testosterone could be determined directly in serum with no sample treatment. The analytical procedure was extremely simple involving only the addition of a 5-µL aliquot of the diluted serum sample to the testosterone-HRP solution up to a final volume of 25 µL. Then, a 10-µL aliquot of this mixture solution was deposited on the electrode surface. Following the procedure described in Section 2.3.4, the analysis of six serum samples spiked with testosterone at the 2.5 ng/mL concentration level yielded a mean analyte concentration of 2.6 ± 0.2 ng/mL, with recoveries ranging between 86 and 112% and a mean value of $98 \pm 7\%$. These results demonstrated fairly well the usefulness of the immunosensor for the rapid and easy determination of testosterone at the concentration levels required in this type of analysis.

4 Conclusions

This novel amperometric immunosensor for testosterone, integrating the advantages of direct immobilization of

monoclonal antitestosterone antibodies on the surface of hybrid composite gold nanoparticles/MWCNTs/Teflon electrodes, represents a useful tool for the rapid and easy determination of this steroid hormone. The combination of the gold nanoparticles capability for allowing biomolecules to retain their biological activity upon adsorption with the electrocatalytic ability of carbon nanotubes, makes the hybrid composite an excellent electrode material for the easy and reliable construction of this immunosensor. Both the range of linearity and the sensitivity achieved are adequate for the analysis of testosterone at the physiological level in serum samples with practically no preparation. Furthermore, the immunosensor lifetime and the reproducibility of the amperometric measurements can be advantageously compared with previous immunosensor designs for testosterone reported in the literature.

Acknowledgements

Financial support from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (Projects DPS2008-07005-C02-01 and CTQ2009-12650) is gratefully acknowledged.

References

- [1] G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 153.
- [2] X. Li, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, Y. Zhuo, Y. Zhang, *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 356.
- [3] D. Dan, X. Xiaoxing, W. Shengfu, Z. Aidong, *Talanta* **2007**, *71*, 1257.
- [4] C. Ding, F. Zhao, R. Ren, J. M. Lin, *Talanta* **2009**, *78*, 1148.
- [5] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 158.
- [6] L. Wu, J. Chen, D. Du, H. Ju, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 1208.
- [7] R. Chai, R. Yuan, Y. Chai, C. Ou, S. Cao, X. Li, *Talanta* **2008**, *74*, 1330.

- [8] Z. S. Wu, J. S. Li, M. H. Luo, G. L. Shen, R. Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2005**, 528, 235.
- [9] C. Hao, F. Yan, L. Ding, Y. Xue, H. Ju, *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, 1359.
- [10] J. Lin, C. He, L. Zhang, S. Zhang, *Anal. Biochem.* **2009**, 384, 130.
- [11] V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* **2007**, 19, 853.
- [12] V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 596, 86.
- [13] M. P. Kreuzer, R. Quidant, G. Badenes, M. P. Marco, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1345.
- [14] H. Lu, M. P. Kreuzer, K. Takkinen, G. G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1756.
- [15] K. Z. Liang, J. S. Qi, W. J. Mu, Z. G. Chen, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2008**, 70, 1156.
- [16] K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Talanta* **2007**, 73, 886.
- [17] J. Manso, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, José M. Pingarrón, *Anal. Biochem.* **2008**, 375, 345.
- [18] J. Manso, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* **2007**, 603, 1.
- [19] R. Cui, H. Huang, Z. Yin, D. Gao, J. J. Zhu, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1666.
- [20] V. Carralero, M. L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 22, 730.
- [21] S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 424, 57.
- [22] H. Licea-Perez, S. Wang, M. E. Szapacs, E. Yang, *Steroids* **2008**, 73, 601.

1.1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución de anti-testosterona 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución de 5 μL de la disolución comercial (murine monoclonal, East Coast Bio., de 3.74 mg mL^{-1}) en 620 μL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de anti-testosterona 1/10: se prepara por dilución de 5 μL de la disolución comercial (sheep polyclonal, Abcam) en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de anti-sheep IgG – HRP 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución de 5 μL de la disolución comercial (rabbit polyclonal, Abcam 2 mg mL^{-1}) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de testosterona – HRP 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución de 5 μL de la disolución comercial (Biospacific, de 1 mg mL^{-1}) en 500 μL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de testosterona 0.1 mg mL^{-1} : se disuelven 2.5 mg de testosterona (Aldrich) en 25 mL de metanol (Scharlau). Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M.

- Disolución de albumina de suero bovino 1 %: se disuelven 0.05 g de BSA (Merck) en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M.
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.5 M: se preparada por dilución de 45 μL de H_2O_2 35% (Scharlau) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disoluciones de mediadores 0.1 M: se han preparado disoluciones de de ferrocianuro (Sigma), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma), catecol (Fluka) e hidroquinona (Sigma), disolviendo la cantidad adecuada de los reactivos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M.
- Disolución patrón de catecol 0.1 M: se disuelven 11 mg de catecol (Fluka) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disoluciones patrón de compuestos interferentes 5 mg mL⁻¹: se disuelven 5 mg del compuesto correspondiente en 1 mL de metanol. Se han estudiado epitestosterona (Sigma), β -estradiol (Sigma), 19-nortestosterona (Sigma) y 17- α -metiltestosterona (Sigma). Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M.
- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M y KCl 0.1 M de pH 7.4: se disuelve la cantidad adecuada de las sales en agua desionizada. El pH se ajusta con NaOH 2 M.
- Disolución de trabajo para determinación de testosterona: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo KCl 0.1 M y la cantidad adecuada de catecol para que la concentración final sea 0.5 mM.

1.1.2. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR

1.1.2.1. PREPARACIÓN DE UN ELECTRODO COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO, NANOPARTÍCULAS DE ORO Y TEFLÓN (AuNPs/MWCNTs/teflón)

El procedimiento seguido para la preparación del material compuesto de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y teflón (AuNPs/MWCNTs/teflón) se basa en un método anterior previamente optimizado por nuestro Grupo de Investigación [Manso, 2007]. En la *Figura 88* se muestra el esquema de preparación del material compuesto y del electrodo compuesto.

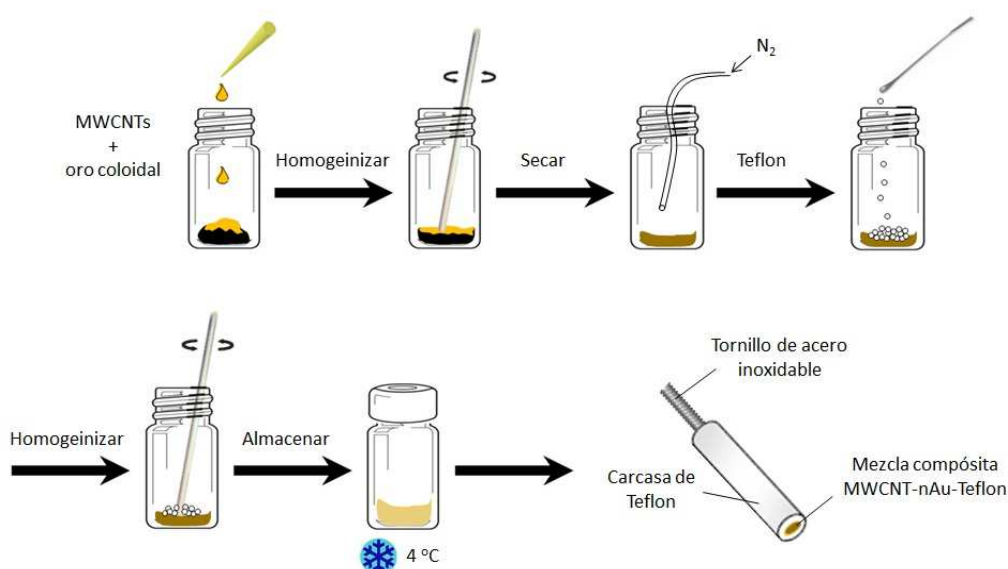


Figura 88. Esquema de la preparación del electrodo compuesto de oro coloidal y nanotubos de carbono.

En primer lugar, 50 mg de nanotubos de carbono (Nanolab, de 30 ± 15 nm de diámetro) se mezclan con 90 μ L de oro coloidal (Sigma, de 20 nm de diámetro) y se homogeneiza por agitación con una varilla de vidrio durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente bajo una corriente de N_2 y, seguidamente, se incorporan 50 mg de teflón (Aldrich) como aglutinante, mezclando del mismo modo hasta la completa homogeneización. Una vez homogeneizado, el material compuesto se almacena en un recipiente de vidrio tapado, en ausencia de luz y a 4 °C, hasta su utilización. Finalmente, para la preparación del electrodo compuesto se introduce una

porción de la mezcla compósita resultante en un tubo de teflón de 3 mm de diámetro provisto de un tornillo de punta plana de acero inoxidable a modo de contacto. Tras comprobar la conducción eléctrica, se pule la superficie del electrodo durante unos segundos, sobre un papel no abrasivo, hasta obtener una superficie brillante.

1.1.2.2. INMOVILIZACIÓN DE ANTI-TESTOSTERONA

A continuación, una vez preparado el electrodo, se procede a inmovilizar la anti – testosterona sobre su superficie.

Sobre la superficie del electrodo compósito AuNPs/MWCNTs/teflón se deposita una alícuota de 10 μL de una disolución de anti – testosterona monoclonal de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se incuba en ambiente húmedo a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa Incubat (P-Selecta) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el electrodo modificado se lava con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación, con el fin de minimizar posibles adsorciones inespecíficas, el electrodo modificado se sumerge en 5 mL de una disolución de BSA al 1% durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se lava cuidadosamente el inmunosensor con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4, quedando preparado para llevarse a cabo el procedimiento de inmunoensayo.

1.1.2.3. PROCEDIMIENTO DE INMUNOENSAYO

Para llevar a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo simultaneo, sobre la superficie del electrodo modificado con anti–testosterona se deposita una alícuota de 10 μL de una disolución mezcla de testosterona (o muestra) y testosterona – HRP (concentración final 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en una proporción 1:4 (v/v), y se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Finalmente se lava con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 y se deja secar a temperatura ambiente en la oscuridad.

En la *Figura 89* se muestra el proceso completo, incluyendo la preparación del inmunosensor, la realización del inmunensayo, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato de la peroxidasa de rabano.

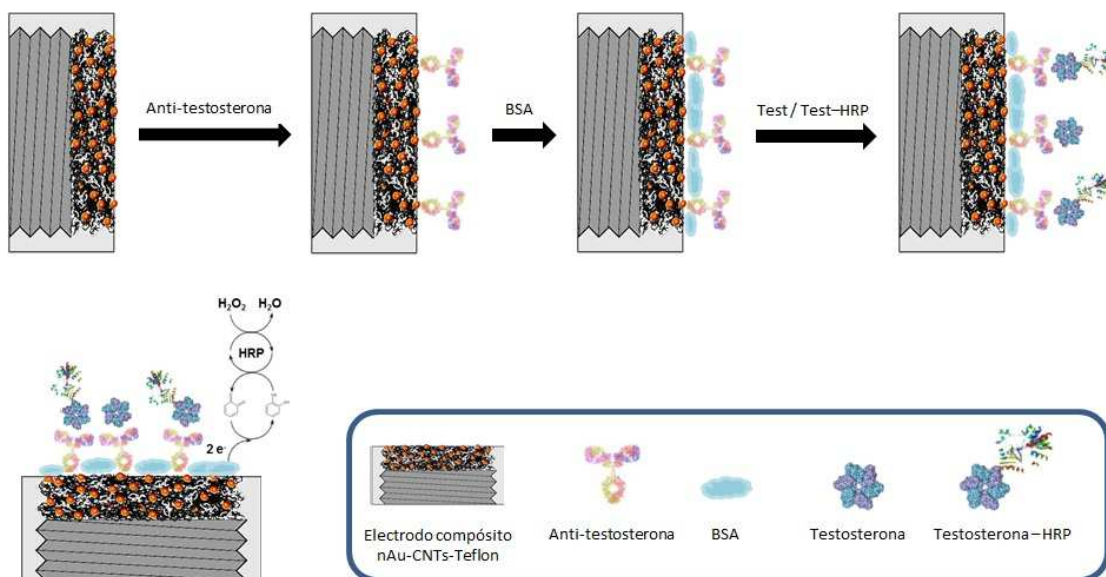


Figura 89. Esquema de la preparación del inmunosensor de testosterona basado en el electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/teflón.

1.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

En la *Figura 90* se representa el sistema empleado en los diferentes experimentos electroquímicos. Las medidas amperométricas se han realizado empleando un detector multicanal EPSILON de BAS controlado mediante el software Chromgraph 2.0.01 (Bioanalytical System). El montaje potencioestático de tres electrodos utilizado se compone de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BAS MF-2063) y un electrodo auxiliar de alambre de Pt (BAS MW-1032), empleándose una célula electroquímica (BAS VC-2) de 5 mL.

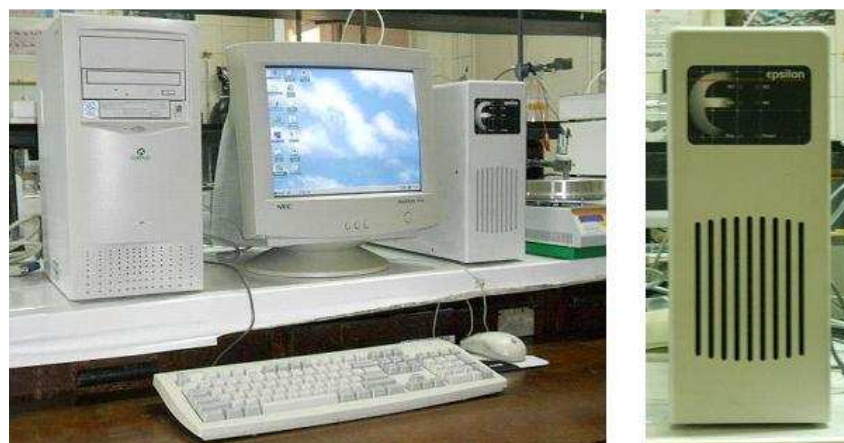


Figura 90. Detector multicanal EPSILON de BAS.

La técnica empleada durante el desarrollo de este trabajo ha sido amperometría en disoluciones agitadas.

1.1.3.1. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

Para obtener los amperogramas, se introducen los tres electrodos en la célula de medida, que contiene 5 mL de la disolución de trabajo, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dura el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona la cantidad adecuada de H₂O₂, y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

1.1.4. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

El inmunosensor desarrollado se ha empleado para la determinación de testosterona en una muestra de suero humano a la que se añadió el analito a un nivel de concentración de 2.5 ng mL⁻¹. Con este fin, el suero sólido comercial (Sigma) se reconstituye en 1 mL de la disolución de testosterona correspondiente, se mezcla cuidadosamente hasta su total disolución, se alicuota y se congela a - 40 °C.

1.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para la determinación de testosterona en suero por amperometría en disoluciones agitadas empleando el inmunosensor desarrollado, solo se requiere una dilución previa de la muestra. De este modo se diluyen 75 µL de suero enriquecido con disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4 hasta un volumen final de 100 µL.

A continuación se mezclan 5 µL de la muestra de suero diluida y 20 µL de la disolución de testosterona-HRP (concentración final de 1 µg mL⁻¹) y, posteriormente, una alícuota de 10 µL de esta mezcla se deposita sobre la superficie del electrodo modificado con anti-testosterona siguiendo el procedimiento de inmunoensayo descrito en el *Apartado 1.1.2.3*.

1.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

La determinación de testosterona se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado. Para ello, el inmunosensor desarrollado se sumerge en la célula de trabajo que contiene 5 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.4, conteniendo KCl 0.1 M y catecol 0.5 mM, y se aplica un potencial de -0.05 V (vs. Ag/AgCl), agitando mecánicamente a velocidad constante.

En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta una alícuota de 50 μ L de una disolución patrón de H_2O_2 0.5 M a la célula de medida, monitorizándose la intensidad de corriente de reducción de la quinona generada en la reacción enzimática que se produce en la superficie del inmunosensor, la cual está directamente relacionada con la cantidad de complejo [antitestosterona – testosterona-HRP] formado, y que a su vez es inversamente proporcional a la concentración de testosterona presente en la mezcla.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, para llevar a cabo la detección amperométrica de testosterona a través del sistema HRP/H₂O₂, se evaluó la idoneidad de diferentes mediadores redox: ferrocianuro, hidroquinona, catecol y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, examinando la selectividad y la sensibilidad de la respuesta. Con este fin, se realizaron medidas amperométricas en el intervalo de potenciales de 0.0 a -0.1 V, empleando un inmunosensor modelo preparado por inmovilización de IgG-HRP sobre la superficie del electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón. En la *Figura 2* del artículo (pág. 172 del mismo) se muestran las curvas de variación de la corriente en función del potencial para cada uno de los mediadores ensayados. Como puede observarse, la mejor sensibilidad se obtuvo para el catecol aplicando un potencial de -0.05 V, valor que también es muy adecuado desde el punto de vista de la selectividad.

1.2.1. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR

1.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Con el fin de obtener la mejor señal electroquímica se optimizaron las siguientes variables:

- La composición del material compuesto AuNPs/MWCNTs/teflón: proporción MWCNTs:teflón y cantidad de oro coloidal.
- Las condiciones de inmovilización de la anti-testosterona sobre la superficie del electrodo: concentración de anti-testosterona y tiempo de duración del proceso.
- Las condiciones óptimas para evitar adsorciones inespecíficas: concentración de BSA y tiempo de incubación en BSA.
- El procedimiento de inmunoensayo: concentración de testosterona-HRP y tiempo de duración del proceso.
- Las condiciones experimentales implicadas en la detección: concentración de peróxido de hidrógeno y concentración del mediador catecol.

Composición del material electródico

En primer lugar se estudiaron las condiciones de fabricación del electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón. Para comenzar, se aprovechó la experiencia previa de nuestro Grupo de investigación [Manso, 2007], que ha demostrado que la inclusión de un porcentaje de teflón del 50% en la mezcla proporciona un material cuyas características mecánicas y conductoras resultan muy apropiadas para la finalidad que se persigue, que es la preparación de electrodos estables y con una buena capacidad y sensibilidad de respuesta. Por el contrario, se sabe que las mezclas que contienen porcentajes de teflón inferiores muestran una peor estabilidad mecánica, que lleva a un fácil desprendimiento de los nanotubos de la superficie del electrodo. Teniendo esto en cuenta, para llevar a cabo los siguientes estudios se seleccionó una composición 50:50 MWCNTs:teflón (p/p).

El efecto de la cantidad de oro coloidal presente en la matriz compósita de nanotubos de carbono-teflón se investigó evaluando la respuesta amperométrica de un inmunosensor modelo preparado por inmovilización de IgG-HRP sobre la superficie del electrodo. Para ello se emplearon diferentes volúmenes de la disolución de oro en el intervalo de 40 a 190 μL . Como puede apreciarse en la *Figura 91*, la corriente de reducción aumenta con la proporción de oro coloidal hasta un valor de 90 μL , lo cual se explica teniendo en cuenta la mejora en la cinética de transferencia electrónica en presencia de las nanopartículas. A partir de este valor, la corriente en estado estacionario permanece prácticamente constante hasta un volumen de 140 μL , disminuyendo para cantidades superiores de oro coloidal. Este comportamiento ya había sido observado en otras configuraciones anteriores y se atribuye a la mayor resistencia y aumento de la capacitancia de la doble capa del electrodo producida por la disminución de los sitios sensores de carbono en el material electródico al incrementarse la proporción de nanopartículas de oro sobre las que se inmovilizan las biomoléculas [Carralero, 2006]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para la preparación del electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón se seleccionó un volumen final de 90 μL de la suspensión de oro coloidal.

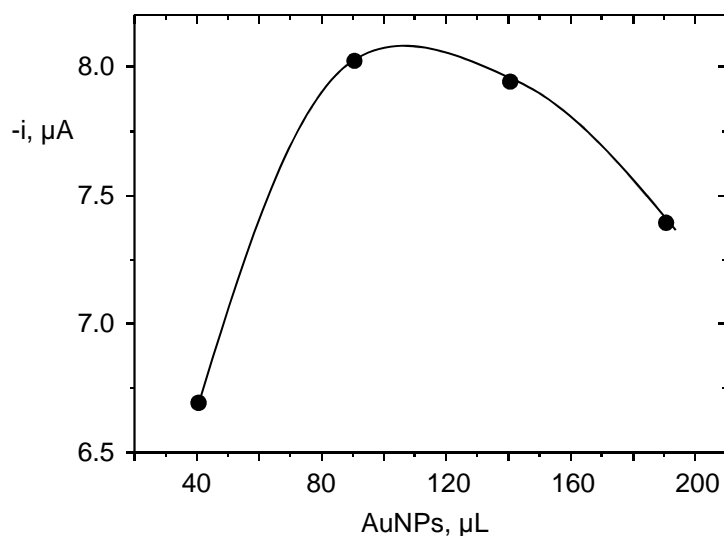


Figura 91. Influencia de la cantidad de oro coloidal sobre la respuesta de AuNPs/MWCNTs/teflón-IgG-HRP.; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

Inmovilización de anti-testosterona

En la preparación de inmunosensores, la cantidad de anticuerpo inmovilizada desempeña un papel muy importante en relación con la sensibilidad y el intervalo lineal alcanzables. En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de anti-testosterona sobre la corriente en estado estacionario medida con distintos inmunosensores preparados con concentraciones de anticuerpo comprendidas entre 0 y $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, empleando testosterona-HRP $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ como marcador enzimático. Como puede observarse en la *Figura 92*, la señal obtenida aumenta con la concentración de anticuerpo hasta un valor de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, concentración para la cual probablemente se alcanza la saturación de los sitios de unión a las nanopartículas de oro. Consecuentemente, para concentraciones superiores de anticuerpo se observa que la corriente permanece constante. Por ello, para la construcción del inmunosensor se seleccionó una concentración de anti-testosterona de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

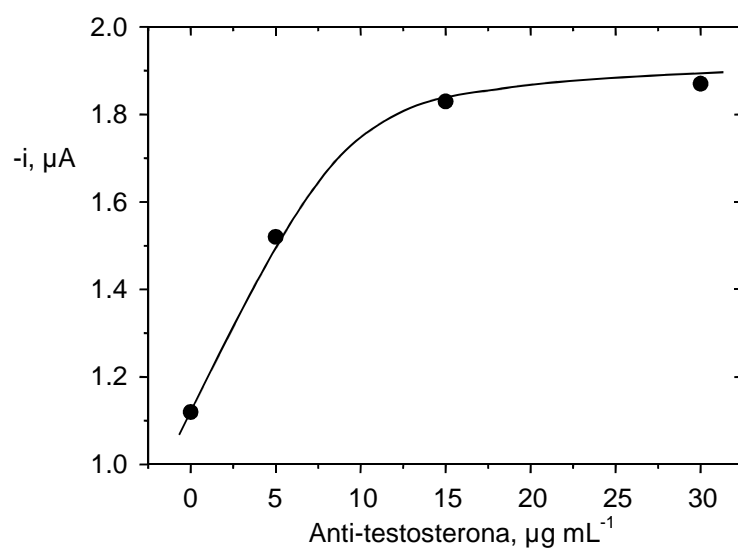


Figura 92. Influencia de la concentración de anti-testosterona sobre la respuesta del inmunosensor.; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

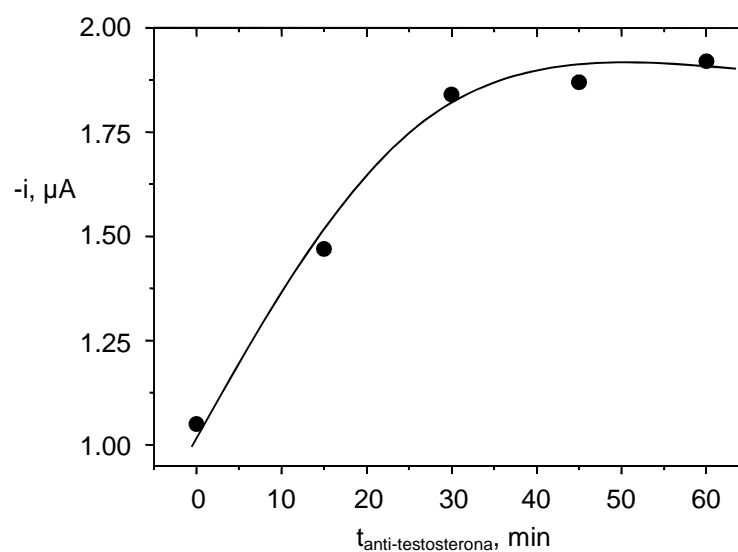


Figura 93. Influencia del tiempo de incubación de la anti-testosterona sobre la respuesta del inmunosensor; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

En la *Figura 93* se muestra la influencia del tiempo de incubación del anticuerpo en el intervalo comprendido entre 15 y 60 min sobre la corriente en estado estacionario. Como puede observarse, un periodo de 30 min es suficiente para lograr la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del electrodo.

Adsorciones inespecíficas

La posible existencia de adsorciones inespecíficas del conjugado testosterona-HRP sobre la superficie del electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón se investigó evaluando la respuesta del inmunosensor en ausencia y en presencia de anti-testosterona. En la *Figura 94* se observa que cuando el inmunosensor se prepara en ausencia de anticuerpo (2) se obtiene una señal que se corresponde con el 57% de la obtenida en presencia de anti-testosterona (1). Esto indica que la testosterona-HRP se adsorbe inespecíficamente en gran extensión sobre la superficie del electrodo compósito. Sin embargo, tal como se muestra en (3), dicha adsorción puede ser minimizada mediante un bloqueo de la superficie del electrodo con BSA.

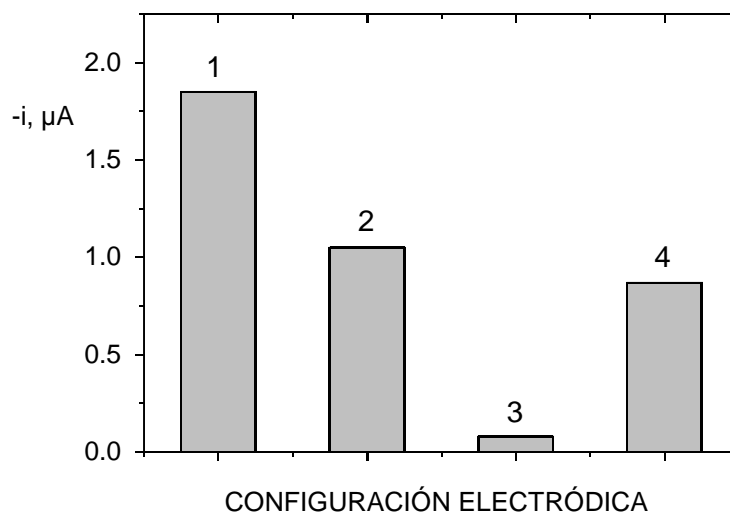


Figura 94. Estudio de las adsorciones inespecíficas en ausencia (1,2) y en presencia (3,4) de BSA: (1,4) AuNPs/MWCNTs/teflón-anti-testosterona-testosterona-HRP; (2,3) AuNPs/MWCNTs/teflón-testosterona-HRP; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

Con el fin de elegir las condiciones experimentales más adecuadas para minimizar las adsorciones inespecíficas sobre los sitios de la superficie del electrodo no ocupados por el anticuerpo, se prepararon disoluciones de BSA (disoluciones de bloqueo) que contenían diferentes concentraciones de proteína, estudiándose la influencia de esta variable y la del tiempo de inmersión del electrodo en la disolución, sobre la respuesta del inmunosensor. Los resultados de la optimización, empleando inmunosensores en ausencia y en presencia de testosterona, se han representado en la *Figura 95*.

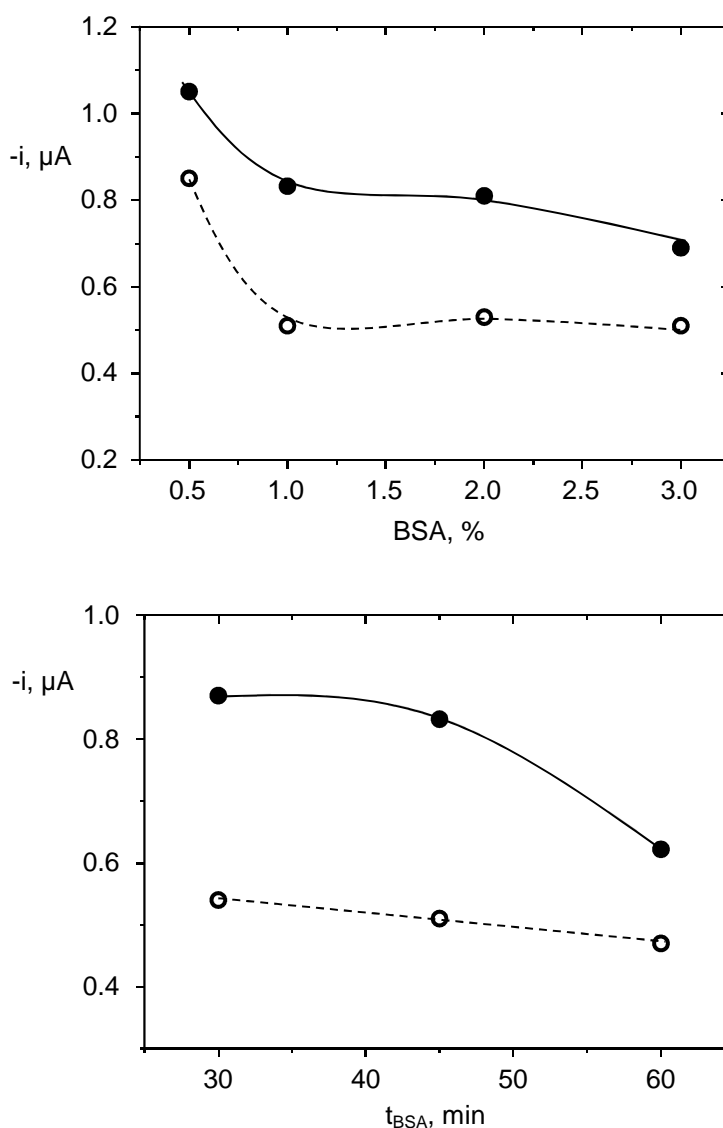


Figura 95. Influencia de la concentración de BSA (superior) y del tiempo de incubación en la disolución de BSA (inferior) sobre la respuesta del inmunosensor, en ausencia (●) y en presencia (○) de testosterona; H₂O₂ 5 mM y catecol 1 mM en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1M a pH 7.4; E_{ap} = -0.05 V.

En relación a la concentración de BSA (*Figura 95 superior*), cuando se prepara el inmunosensor en ausencia de testosterona, la mayor señal se obtiene para un valor del 0.5%, disminuyendo la corriente de forma notable hasta una concentración del 1%, valor a partir del cual disminuye suavemente. Sin embargo, la diferencia de respuesta obtenida con el inmunosensor preparado en ausencia y en presencia de testosterona para una concentración de BSA del 0.5% es menor que la correspondiente al 1%, debido probablemente al mayor número de adsorciones inespecíficas de testosterona-HRP sobre el electrodo, lo cual disminuye el nivel de competición en el caso de emplear una concentración de BSA del 0.5%.

Por otro lado, a medida que aumenta el tiempo de incubación en la disolución de bloqueo (*Figura 95 inferior*), la señal obtenida con el inmunosensor en ausencia de testosterona disminuye ligeramente hasta 45 min, decreciendo a continuación de forma brusca para tiempos superiores. Esto se debe probablemente al bloqueo parcial de los parátomos del anticuerpo. Considerando como criterio de selección la diferencia entre las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de testosterona y, con el fin de conseguir la mayor sensibilidad y una menor duración del proceso, se consideró suficiente sumergir el electrodo modificado con anti-testosterona en una disolución de BSA al 1% durante 30 min para minimizar las adsorciones inespecíficas de la testosterona-HRP.

Procedimiento del inmunoensayo

Para la determinación de testosterona se empleó un formato de tipo competitivo en el que el analito (testosterona) y el conjugado testosterona-HRP compiten por los sitios de unión de la anti-testosterona, que se encuentra en concentración limitante inmovilizada sobre la superficie del electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/teflón. En la *Figura 96* se ha representado la dependencia de la corriente en estado estacionario con la concentración de testosterona-HRP, estudiada en el intervalo $0 - 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, empleando las demás variables óptimas. Como puede observarse, la señal aumenta de forma pronunciada desde 0 hasta $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, debido a la progresiva interacción del conjugado enzimático con el anticuerpo, aumentando posteriormente de forma ligera hasta $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, debido a que se está alcanzando la sobresaturación de los sitios de

unión de los anticuerpos inmovilizados. A partir de esta concentración, la corriente permanece prácticamente constante, por lo que fue la elegida para estudios posteriores.

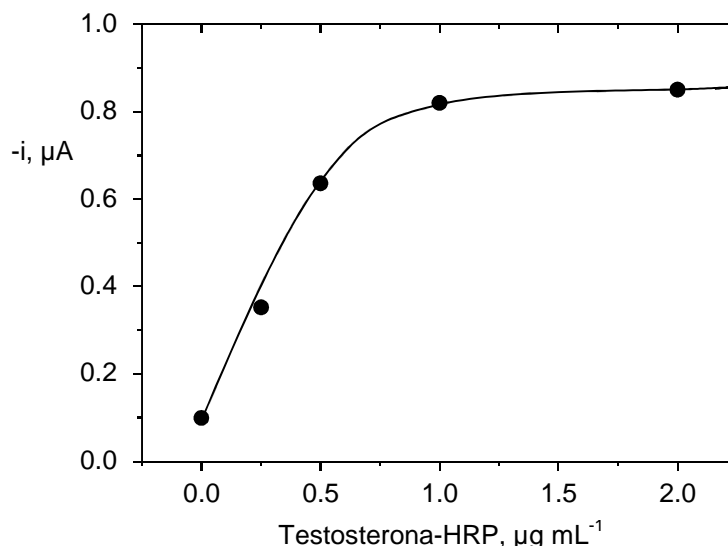


Figura 96. Influencia de la concentración de testosterona–HRP sobre la respuesta del inmunosensor.; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap}=-0.05$ V.

En un formato de tipo competitivo, la sensibilidad depende de la concentración del conjugado, de forma que cuanto mayor es la concentración de éste en disolución, mayor será la de analito requerida para que ocurra la competición. Con el fin de seleccionar la concentración más apropiada de testosterona-HRP, se comparó el comportamiento de distintos inmunosensores incubados en el conjugado, en concentraciones 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para distintas concentraciones de testosterona (Figura 3 del artículo, pág. 173 del mismo). Como se puede observar, y en concordancia con el estudio anterior, la corriente en estado estacionario aumenta para concentraciones bajas de testosterona cuando se emplea 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de conjugado en lugar de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo para una concentración de testosterona-HRP de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no se observa aumento apreciable de la señal, debido probablemente a que todos los parátomos de los anticuerpos inmovilizados han sido ocupados. Además, también se observa un desplazamiento hacia la izquierda de las correspondientes

curvas a medida que la concentración de conjugado es menor. Este hecho implica una disminución del valor de EC_{50} y del límite de detección cuando la concentración de conjugado es menor, debido a que en ese caso se requiere menos concentración de analito para que ocurra la competición. Sin embargo, a medida que disminuye la concentración de testosterona-HRP también lo hace la señal y, por tanto, la pendiente de Hill, un parámetro determinante en la sensibilidad del ensayo. Finalmente, por todo lo comentado anteriormente, se seleccionó una concentración de testosterona-HRP de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para llevar a cabo el inmunoensayo competitivo.

Con objeto de que el proceso de competición transcurriese en la mayor extensión posible, se estudió también la influencia del tiempo de incubación con el conjugado enzimático del electrodo modificado con anti-testosterona en el intervalo de 15 a 60 min. Como puede observarse en la *Figura 97*, un tiempo de 30 min es suficiente para asegurar que la competición es completa.

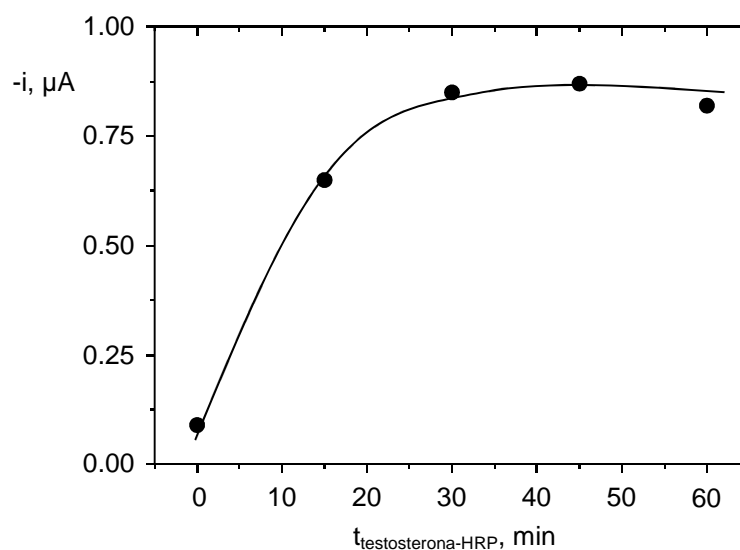


Figura 97. Influencia del tiempo de incubación de la testosterona–HRP sobre la respuesta del inmunosensor; H_2O_2 5 mM y catecol 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{op} = -0.05$ V.

Detección

Para estudiar la dependencia de la señal electroquímica con la concentración de sustrato empleada en el ensayo, se varió la concentración de H_2O_2 entre 0.1 y 5 mM manteniendo fija la concentración de mediador. Como puede observarse en la *Figura 98*, la señal amperométrica aumenta con la concentración de sustrato y tiende a estabilizarse a partir de una concentración de H_2O_2 1 mM. Con el fin de asegurar que la velocidad de la reacción enzimática únicamente dependa de la cantidad de enzima, finalmente se seleccionó una concentración de sustrato de 5 mM para llevar a cabo la determinación de testosterona.

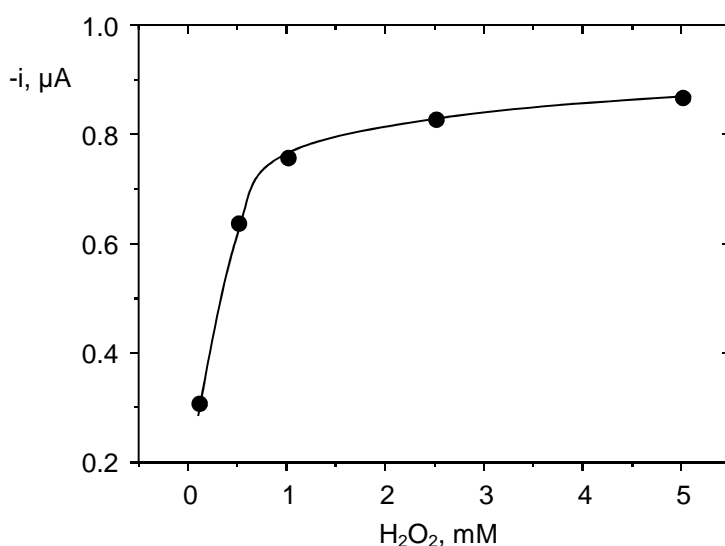


Figura 98. Influencia de la concentración de H_2O_2 sobre la respuesta del inmunosensor; catecol 1 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

Asimismo la concentración de catecol se varió entre 0 y 1 mM. Como se observa en la *Figura 99*, la corriente amperométrica aumenta rápidamente con la concentración de mediador hasta 0.5 mM, permaneciendo constante para concentraciones superiores, por lo que se seleccionó este valor.

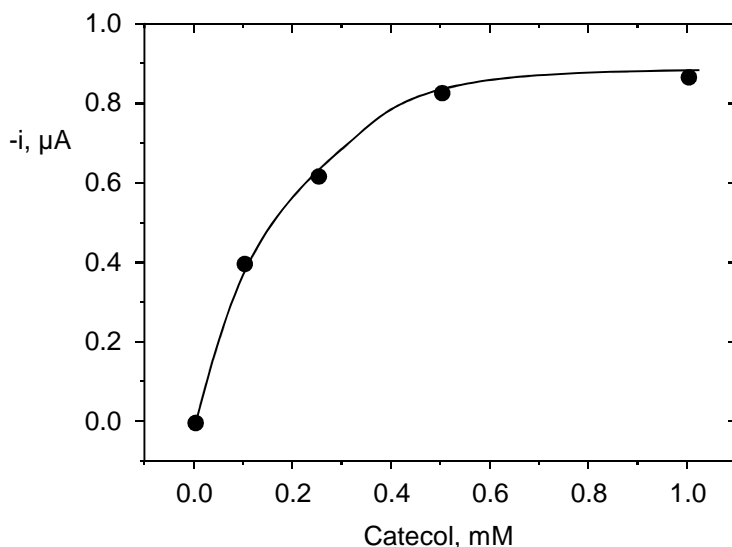


Figura 99. Influencia de la concentración de catecol sobre la respuesta del inmunosensor; H_2O_2 5 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

En la *Tabla 14* se presenta un resumen de las variables experimentales estudiadas y los valores elegidos para trabajar con el inmunosensor competitivo desarrollado.

Tabla 14. Optimización de variables experimentales para la determinación de testosterona empleando el inmunosensor AuNPs/MWCNTs/teflón-anti-testosterona-testosterona-HRP.

Configuración	Variable experimental	Rango estudiado	Valor seleccionando
anti-testosterona-AuNPs/MWCNTs/teflón	MWCNTs:teflón		50:50
	AuNPs, μL	40 – 190	90
	anti-testosterona, μg mL ⁻¹	0 – 30	15
	$t_{\text{anti-testosterona}}$, min	15 – 60	30
	BSA, %	0.5 – 3	1
	t_{BSA} , min	15 – 60	30
	testosterona-HRP, μg mL ⁻¹	0 – 2	1
	$t_{\text{testosterona-HRP}}$, min	15 – 60	30
	H_2O_2 , mM	0.1 – 5	5
	catecol, mM	0 – 1	0.5
	E_{ap} , V	0.0 – -0.1	-0.05

1.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA

Empleando las condiciones experimentales previamente optimizadas, se construyó un calibrado en el intervalo comprendido entre 10^{-3} y 10^3 ng mL⁻¹ (Figura 4 del artículo, pág. 174), siendo el intervalo lineal de 0.1 a 10 ng mL⁻¹ (r=0.993). Este intervalo es adecuado para llevar a cabo la determinación de testosterona en muestras de suero humano, en el que las concentraciones esperables se sitúan en el intervalo de 0.2 a 40 ng mL⁻¹ [Licea-Pérez, 2008].

La curva de calibrado obtenida se ajusta (r=0.996) a una ecuación paramétrica típica de los formatos competitivos [Tijssen, 1985]:

$$y = \frac{i_{max} - i_{min}}{1 + EC_{50}/x} + i_{min}$$

donde “ i_{max} ” e “ i_{min} ” son los valores de corriente máxima y mínima de la curva de calibrado, (0.85 ± 0.02) μ A y (0.05 ± 0.04) μ A, respectivamente. El valor de EC_{50} , punto correspondiente al 50% de competición, fue de 1.0 ± 0.2 ng mL⁻¹ y la pendiente de Hill de -1.2 ± 0.2 .

Por otra parte, el límite de detección se calculó a partir de la siguiente ecuación [Conneely, 2007]:

$$LOD = EC_{50} \left(\frac{i_{max} - i_{min}}{i_{max} - i_{min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

donde “s” es la desviación estándar de la corriente en estado estacionario medida en ausencia de testosterona, ± 0.02 μ A (n=10), con una RSD del 2.4%. El límite de detección obtenido a partir de cinco calibrados fue de 85 ± 6 pg mL⁻¹ (intervalo de confianza calculado para un valor de significación de 0.05). Este valor, tal como se indica en el artículo, es similar (90 ± 13 pg mL⁻¹) al encontrado en la bibliografía para un inmunosensor de testosterona preparado por inmovilización del conjugado testosterona-BSA sobre un electrodo serigrafado de carbono (SPCE) utilizando un fragmento Fab de anti-testosterona [Lu, 2007]_b.

1.2.1.3. ESTABILIDAD

Uno de los aspectos más importantes a investigar cuando se desarrolla un biosensor electroquímico es su estabilidad. La reproducibilidad de la respuesta es uno de los factores más críticos a la hora de determinar las posibilidades de selección de un biosensor para aplicaciones en el control de procesos y monitorizaciones rutinarias. Para llevar a cabo este estudio, se investigaron diferentes aspectos relacionados con este parámetro realizando medidas repetidas con el inmunosensor desarrollado. En primer lugar se estudió la reproducibilidad de las medidas efectuadas con diez inmunosensores diferentes preparados simultáneamente con el mismo material AuNPs/MWCNTs/teflón para tres niveles de concentración de testosterona distintos (0.05, 0.5 y 100 ng mL⁻¹), empleando las mismas disoluciones de anticuerpo, conjugado enzimático y mediador. También se evaluó la reproducibilidad de las medidas efectuadas con nueve inmunosensores diferentes preparados simultáneamente con distintos compósitos AuNPs/MWCNTs/teflón para tres niveles de concentración de testosterona diferentes (0.05, 0.5 y 100 ng mL⁻¹), empleando las mismas disoluciones de anticuerpo, conjugado enzimático y mediador.

En el primer caso, los valores de la desviación estándar relativa para cada uno de los niveles de testosterona ensayados fueron 2.6, 3.5 y 6.4%, respectivamente, mientras que en el segundo caso los valores obtenidos fueron 2.8, 4.6 y 8.2%, respectivamente. En ambos casos se puede observar que los peores resultados se obtienen cuando se emplea la mayor concentración de testosterona, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta el bajo valor de corriente medido en estos casos. Finalmente, los resultados obtenidos demuestran una buena reproducibilidad para los procesos de fabricación del inmunosensor y del material electrónico AuNPs/MWCNTs/teflón.

Finalmente, se estudió el tiempo de vida del inmunosensor desarrollado. Para ello se prepararon distintos inmunosensores en ausencia de testosterona, y se almacenaron a 4 °C, para su posterior utilización diaria. Aunque la respuesta amperométrica era un 10% menor después del primer día de almacenamiento, como se observa en *la Figura 100* posteriormente permaneció dentro de los límites de

control (± 3 veces la desviación estándar de las medidas realizadas el día 1, $n=3$) durante 7 días. El día octavo, la respuesta fue un 70% de la obtenida el día de la preparación de los inmunosensores. El resultado obtenido supone una mejora con respecto a otros inmunosensores electroquímicos de testosterona descritos en la bibliografía, como por ejemplo el diseño competitivo basado en la inmovilización de testosterona-BSA sobre un SPCE, en el que la estabilidad era tan solo de 4 días [Conneely, 2007].

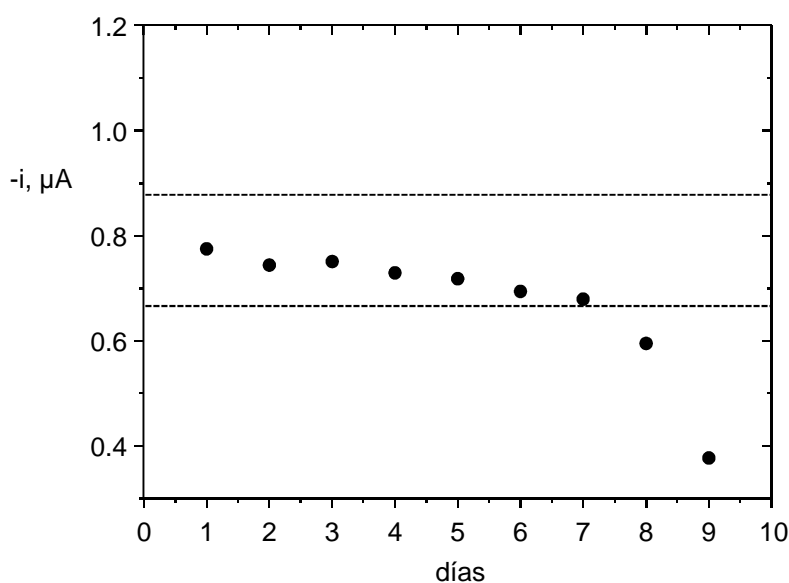


Figura 100. Diagrama de control construido para el inmunosensor AuNPs/MWCNTs/teflón-anti-testostrenona-testosterona-HRP; H_2O_2 5 mM y catecol 0.5 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.4; $E_{ap} = -0.05$ V.

La buena estabilidad obtenida puede atribuirse a la presencia de las nanopartículas de oro en el material electródico, cuya capacidad para la adsorción de proteínas manteniendo su actividad biológica es bien conocida y se ha puesto de manifiesto en otras configuraciones anteriores basadas en electrodos compósitos nanoestructurados [Manso, 2007]. Por otra parte, a esta ventaja se añade otra que es también común a otros biosensores basados en electrodos compósitos, cuya superficie, transcurrido el tiempo de vida útil, puede regenerarse mediante pulido. En este caso, la superficie electródica AuNPs/MWCNTs/teflón se puede regenerar puliendo durante 5 segundos sobre un papel no abrasivo, quedando preparada para una nueva inmovilización del anticuerpo.

1.2.1.4. INTERFERENCIAS

Se realizaron estudios de reactividad cruzada sobre el inmunosensor investigando su comportamiento en presencia de distintas hormonas de interés en el dopaje, todas ellas estructuralmente relacionadas con la testosterona (*Figura 5* del artículo, pág 174). Los experimentos se llevaron a cabo midiendo la señal amperométrica obtenida empleando disoluciones de interferente en lugar del analito, comparándose además los resultados obtenidos con dos tipos de anticuerpos: anti-testosterona monoclonal y policlonal. En la *Figura 6a* del artículo (pág. 175 del mismo), se representaron las respuestas amperométricas obtenidas para ambos tipos de anticuerpos, expresadas como el porcentaje de corriente medido con respecto a la corriente obtenida en ausencia de testosterona (100%). A modo de ejemplo, en la *Figura 6b* del artículo, se mostraron también algunos amperogramas obtenidos en ausencia de testosterona, así como los resultantes de llevar a cabo el inmunosensayo en presencia de epitestosterona, β -estradiol, 19-nortestosterona y 17α -metiltestosterona a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como era de esperar, el anticuerpo monoclonal ofrece una mayor especificidad, con una baja reactividad cruzada para las hormonas epitestosterona, β -estradiol y 17α -metiltestosterona. Independientemente del anticuerpo utilizado, la mayor interferencia se produce en presencia de 19-nortestosterona. Esto es debido a que su estructura difiere de la de la testosterona solamente en el grupo metilo de la posición C-19, siendo idénticos los anillos D de ambos esteroides. Por otro lado, es importante destacar que la epitestosterona no interfiere en ninguna de las concentraciones ensayadas, a pesar de que su estructura sólo difiere en la orientación espacial del grupo hidroxilo en la posición C-17. Esto significa que la anti-testosterona seleccionada, es capaz de discriminar en esa posición por motivos de orientación.

1.2.2. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO

El inmunosensor desarrollado se aplicó a la determinación de testosterona en muestras de suero humano a las que se añadió testosterona. Primero se evaluó la existencia de efecto matriz preparando los inmunosensores con muestra que no contenía testosterona, realizando diluciones con diferentes volúmenes de disolución reguladora de fosfato. Se observó que una dilución 1.5/2.0 era suficiente para evitar cualquier efecto de los componentes del suero sobre la respuesta del inmunosensor, de forma que para realizar las medidas, 75 μL de suero se diluyeron hasta un volumen final de 100 μL con disolución reguladora fosfato. En estas condiciones, la pendiente de Hill del calibrado de la muestra (-1.0 ± 0.2) no difiere significativamente del valor obtenido para el calibrado de patrones (-1.2 ± 0.2), aplicando el método test de la t de Student para un nivel de significación de 0.05.

Siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 1.1.4.* se analizaron seis muestras de suero a las que se añadió testosterona a un nivel de concentración de 2.5 ng mL^{-1} , obteniéndose una concentración media de $2.46 \pm 0.2 \text{ ng mL}^{-1}$ (intervalo de confianza calculado para $\alpha=0.05$) y un valor de RSD del 7.8%. Empleando el método test de la t de Student se deduce que no hay diferencias significativas entre la concentración de testosterona adicionada y la recuperada a un nivel de significación de 0.05. La recuperación media obtenida para el nivel de testosterona estudiado ha sido de $(98 \pm 7) \%$. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad del inmunosensor para la determinación de testosterona en suero humano a los niveles requeridos, implicando sólo una dilución simple como tratamiento de la muestra.

INMUNOSENSOR DE TESTOSTERONA BASADO EN MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

2

En la preparación de inmunosensores, la etapa de inmovilización de anticuerpos constituye un factor crítico en su buen funcionamiento. En esta etapa puede producirse una pérdida de bioactividad al quedar bloqueado el acceso a la zona de reconocimiento antigénico, lo que impide la formación del inmunocomplejo [Lu, 1996]. Para evitar este problema, la superficie del sensor debe recubrirse previamente de algún compuesto capaz de interactuar con el anticuerpo orientándolo adecuadamente. Una de las especies utilizadas con esta finalidad es la proteína A, que permite la formación de complejos multiméricos con la región constante de los anticuerpos, dejando libres los sitios de unión al antígeno.

Por otro lado, como se ha comentado en la Introducción, las micropartículas magnéticas (MBs) constituyen actualmente una herramienta muy útil y versátil para la preparación de plataformas inmunosensoras. Las características de estas partículas han sido descritas anteriormente, debiéndose resaltar aquí que su uso permite la inmovilización de una alta concentración de biomoléculas al tiempo que facilita la aplicación de las etapas de preparación del inmunosensor.

En este trabajo se han elegido micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A para preparar un inmunosensor de testosterona. La configuración desarrollada está basada en un formato de tipo competitivo usando hidroquinona como mediador redox y H_2O_2 como sustrato enzimático. La detección electroquímica

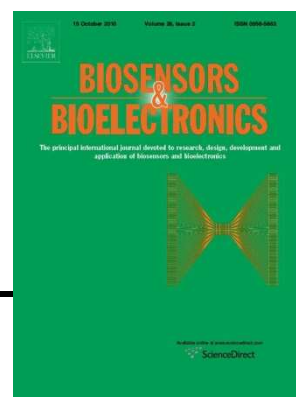
se realiza sobre electrodos serigrafados de carbono con peroxidasa como enzima marcadora.

Al igual que en otros capítulos, a continuación se muestra la publicación a que dio lugar este trabajo, comentándose posteriormente los resultados que se han considerado más relevantes, así como aquellos estudios que no se incluyeron en el artículo o que aparecieron en la información complementaria del mismo.

An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes

Marcos Eguílaz, María Moreno-Guzmán, Susana Campuzano, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño, José M. Pingarrón

Biosensors & Bioelectronics



Vol. 26 pp. 517-522, 2010



An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes

Marcos Eguílaz, María Moreno-Guzmán, Susana Campuzano, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño*, José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Comptense of Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2010

Received in revised form 29 June 2010

Accepted 15 July 2010

Available online 22 July 2010

Keywords:

Testosterone

Immunosensor

Electrochemical

Magnetic particles

Screen-printed electrodes

ABSTRACT

A disposable electrochemical immunosensor using screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and protein A-functionalized magnetic beads (MBs) was developed for the determination of testosterone. Anti-testosterone was immobilized onto MBs and a direct competitive immunoassay involving testosterone labeled with peroxidase (HRP) was performed. The resulting conjugate was trapped on the SPCE with a small magnet. Testosterone determination was carried out by amperometry at -0.2 V upon H_2O_2 additions using hydroquinone (HQ) as the redox mediator. The experimental variables involved in the immunosensor response to testosterone were evaluated. Under the optimized conditions, a calibration plot for testosterone was obtained with a linear range between 5.0×10^{-3} and 50 ng/mL ($r = 0.995$). The detection limit was 1.7 pg/mL and the EC_{50} was 0.25 ± 0.04 ng/mL. These characteristics are notably better than those achieved with other reported immunosensors. Furthermore, anti-testosterone/MBs conjugates were shown to be stable for at least 25 days. A good selectivity was also found against other steroid hormones. The usefulness of the immunosensor was demonstrated by analyzing human serum spiked with 1 and 10 ng/mL testosterone.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Testosterone is a steroid hormone from the androgen group playing important roles in male sexual differentiation, protein synthesis and human physical performance (Chen et al., 2009). This and other anabolic androgenic steroids (AAS) have been used by athletes since 1950s as doping substances to increase muscle mass. So, the World Anti-Doping Agency (WADA) prohibited their use to ensure fair play and to protect athletes from possible adverse side effects (Houtman et al., 2009). Chromatographic methods including HPLC (Li et al., 2002), GC-MS (Saudan et al., 2004) and LC-MS (Leinonen et al., 2004) were developed for the detection of testosterone in biological fluids. They provide quantitative and confirmatory results with high sensitivity and selectivity, but need expensive instrumentation and suffer from considerable time delays between sampling and obtaining results. These disadvantages limit routine use and assaying to extensive laboratory environments (Lu et al., 2007). Immunosensors using different modes of detection were also used. However, some difficulties arise in immunosensing of steroid hormones since they are small, rigid, hydrophobic molecules, and possess few functional groups for specific interaction with antibodies. In this context, the preparation

of bioelectrodes combining immobilization methods for improving antibodies stability with no significant loss of biological activity, with sensitive electrochemical transducers, constitutes a challenge. Magnetic beads (MBs) are recognized as a powerful and versatile tool for the development of immunosensing platforms. Their large active surface area allows the immobilization of high biomolecules loadings onto the solid phase of the transducer through the application of a magnetic field, as well as a decrease of matrix effects (Zacco et al., 2007). This approach separates the immunoreaction steps from the step of electrochemical detection and facilitates the optimization of experimental conditions (Centi et al., 2007). Various examples of application of this methodology were published concerning the preparation of electrochemical immunosensors for food (Ricci et al., 2007) and environmental (Centi et al., 2007) analysis.

Few electrochemical immunosensors were reported for the determination of testosterone. A recombinant Fab fragment-based configuration prepared by immobilization of the testosterone conjugate on the surface of SPCEs was applied to bovine urine (Lu et al., 2007). An indirect format system involving immobilized protein hapten conjugate, an antibody and a HRP-labelled anti-species, and using 3,3',-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)/ H_2O_2 substrate mixture, was also developed (Conneely et al., 2007).

In this work, we describe a novel electrochemical immunosensor for the quantification of testosterone using SPCEs and protein A-MBs. Anti-testosterone was immobilized onto protein A-MBs,

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4317; fax: +34 91 394 4329.
E-mail address: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

and a competitive immunoassay involving testosterone labeled with peroxidase was performed. The resulting conjugate was trapped on the surface of the SPCE with a small magnet. Testosterone determination was accomplished by amperometry upon H_2O_2 additions and using HQ as the redox mediator.

2. Experimental

2.1. Apparatus and electrodes

Electrochemical measurements were carried out using a PSTAT 10 potentiostat (Autolab). SPCEs (4 mm \varnothing) (DropSens) including a silver pseudoreference electrode and a carbon counter electrode, were used. A P-Selecta ultrasonic bath, an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta) and a P-Selecta Agimatic magnetic stirrer (Scharlab), were also used. A magnetic separator Dynal MPC-S (Dynal Biotech ASA) and a neodymium magnet (AIMAN GZ) to control the attraction of magnetic beads to the SPCE were also used.

2.2. Reagents and solutions

Monoclonal murine anti-testosterone (3.74 mg/mL) was from East Coast Bio. Testosterone–HRP (1 mg/mL) was from Biospecific. Testosterone (Fluka, >99%) was also used. Diluted solutions of anti-testosterone were prepared in B&W 0.1 M phosphate (Scharlau, 99%) and 0.01% Tween[®] 20 (Aldrich) buffer solution pH 8.2. A 0.01 M phosphate, 0.138 M NaCl (Scharlau, 99%) and 2.7 mM KCl (Scharlau, 99%) buffer solution pH 6.8, and a 0.1 M PBS solution pH 7.0, were also used. A 5 mg/mL stock solution of testosterone was prepared in methanol. 1000 ng/mL stock testosterone–HRP solutions were prepared daily in 0.1 M PBS pH 6.8. More diluted solutions of testosterone and testosterone–HRP were prepared daily by dilution with PBS pH 6.8. Catechol, HQ, TMB, ferricyanide (Sigma), and H_2O_2 (Scharlau, 35%) were also employed. 100 mM HQ and 100 mM H_2O_2 stock solutions were prepared daily in 0.1 M PBS pH 7.0. 5 mg/mL stock methanolic solutions of cortisone, corticosterone, progesterone, cortexolone, epitestosterone, 19-nortestosterone, 17- α -methyltestosterone and β -estradiol, (Sigma), were also prepared (see Figure S1 suppl. material). From these, 1000 ng/mL stock and more diluted solutions were prepared in 0.01 M PBS pH 6.8. Protein A–modified magnetic beads (30 mg mL⁻¹) (Dynabeads[®] Protein A, Prod. n^o. 100.02 D) were purchased from Dynal Biotech ASA. They are uniform, 2.8 μm diameter superparamagnetic polymer particles with recombinant protein A covalently coupled to the surface. The recombinant Protein A employed is a 45 kDa protein containing four binding sites for the Fc region of Ig, but without any albumin binding sites. From this stock solution, a 3 mg/mL suspension was prepared in B&W buffer solution pH 8.2.

2.3. Samples

Analyzed samples were lyophilized human serum (Sigma) spiked with testosterone. Testosterone concentrations tested were 1 and 10 ng/mL. The solid serum was reconstituted in 1 mL of testosterone solution by mixing up to total dissolution, aliquoted and frozen at -40°C until assayed. Control serum samples (unspiked) were prepared in 1 mL of 0.01 M PBS pH 6.8, and dilutions of testosterone were then made with this control serum stock.

2.4. Immunoassay procedure

5 μL of 3 mg/mL MBs suspension were transferred to an eppendorf tube and resuspended in 50 μL of a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-testosterone solution prepared in B&W buffer solution pH 8.2. After 10 min incubation at 37°C under stirring, the tube was placed on

the magnet holding block for 2 min. Once MBs were deposited on the bottom of the test tube, supernatant was removed and the beads bearing the antibodies were washed twice with 100 μL of B&W buffer and, once more, with 100 μL of PBS pH 7.0. Each washing step consisted of a resuspension of the beads in the washing solution and gentle stirring for 1 min followed by separation with the magnet for 2 min to remove the solution. This process allowed removing of unbound antibody. In order to perform the competitive assay, anti-testosterone–protein A–MBs were resuspended in 50 μL of a 1:9 v/v mixture solution of testosterone–HRP (final concentration, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and testosterone sample. Incubation was carried out at 37°C under stirring for 45 min and the tube was placed on the magnet holding block for 2 min. Supernatant was removed and two washing steps with two 100 μL aliquots of 0.1 M PBS pH 7.0 were carried out to remove unbound species. Further, testosterone–HRP/testosterone–anti-testosterone–MBs were resuspended in 45 μL of a 0.8 mM HQ solution in PBS pH 7.0 and transferred onto the SPCEs by placing a magnet under the electrode. Amperometric measurements were performed by adding 5 μL of 5 mM H_2O_2 solution onto the electrode. The reduction current from the enzymatically oxidized HQ was monitored at -0.20V .

3. Results and discussion

Fig. 1 schematizes the immunoassay procedure. Anti-testosterone was immobilized onto protein A–MBs through the strong affinity of Protein A for the Fc region of Ig molecules. A competitive assay between testosterone and testosterone–HRP for the binding sites of the immobilized Ab was performed. The addition of H_2O_2 in the presence of HQ produced quinone as the enzyme reaction product, whose electrochemical reduction was used to monitor the affinity reaction. After each incubation or washing steps, MBs were separated from the solution by means of a small magnet.

The voltammetric behaviour at the SPCEs of different compounds that can act as redox mediators with HRP was evaluated. Figure S2 in suppl. material shows CVs obtained upon placing onto the SPCEs 1.0 mM solutions of ferrocyanide, HQ, catechol or TMB, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP and 5 mM H_2O_2 in PBS pH 7.0. A higher electrocatalytic activity, indicated by the enlargement of the cathodic current and the sharp decrease in the anodic current, was observed using HQ as the mediator and, so, this compound was selected for further work.

The potential value applied to perform the amperometric measurements was chosen by recording the current in the $+0.05$ to -0.3V range from 5 mM H_2O_2 solutions in the presence of 1 mM HQ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP. The results obtained (not shown) suggested a potential of -0.2V as appropriate to achieve a good sensitivity and precision.

3.1. Optimization of the experimental variables involved in the immunosensor response to testosterone

The influence of H_2O_2 concentration on the amperometric responses was checked in the 0.01–5 mM range. Current increased with the substrate concentration between 0.01 and 0.5 mM, then levelling off (see Figure S3a suppl. material). Taking into account that high H_2O_2 concentrations can denaturalize HRP (Xiao et al., 1999), and in order to ensure that the enzyme reaction rate depended only on HRP concentration, 0.5 mM H_2O_2 was selected. Furthermore, the influence of the HQ concentration was tested in the 0–2 mM range. Current response rapidly increased with HQ concentration up to 0.8 mM and then levelled off (Figure S3b suppl. material). Thus, the latter concentration was chosen for further work.

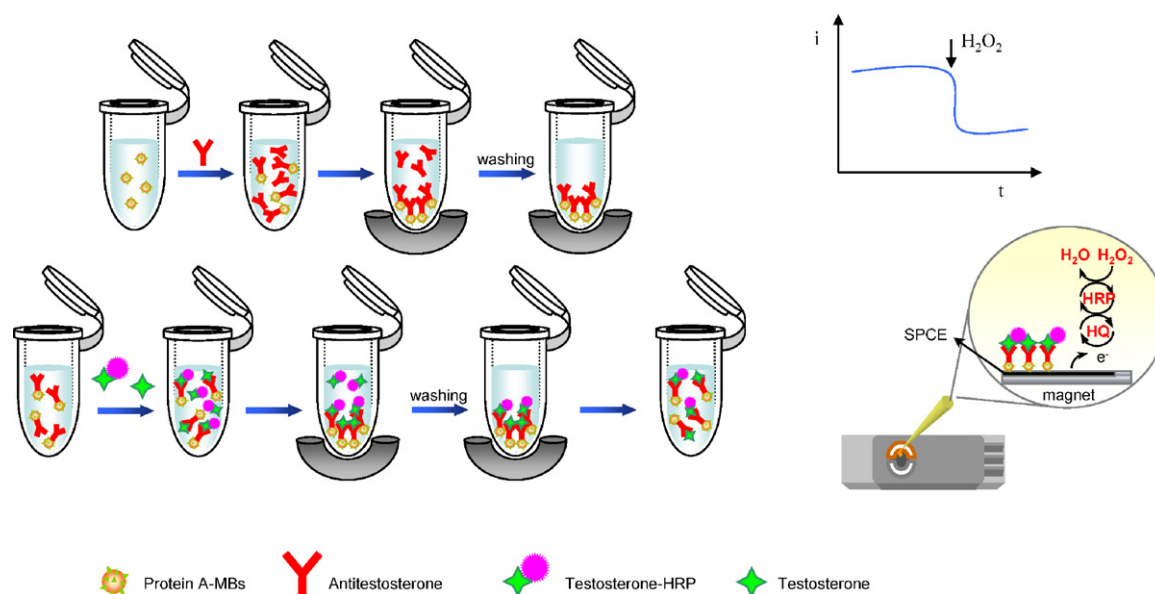


Fig. 1. Scheme of the immunoassay procedure.

The effect of the amount of MBs immobilized on the SPCE was evaluated in the 0–300 μg range in the presence of 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-testosterone and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP. Fig. 2a shows an increase in the current with the MBs loading up to 90 μg . Larger loadings produced a slight but continued current decrease, probably due to a higher electron transfer resistance. Furthermore, in the absence of anti-testosterone, a practically negligible unspecific signal was observed for low MBs loadings.

The Ab loading onto MBs was also optimized. Fig. 2b shows the results obtained by immobilizing 50 μL of anti-testosterone solution prepared in the 0–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range, using MBs loadings between 7.5 and 60 μg , and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP. The steady-state current increased in all cases with the Ab loading up to the MBs saturation level. The lower the MBs loading the lower the anti-testosterone concentration required to reach such saturation level. According to the theory, decreasing concentrations of antibody will afford greater sensitivity as they will require less analyte to reach a constant reference level (Ruth, 2001). Therefore, as a compromise between a sufficiently high current and a small MBs loading, 15 μg MBs and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-testosterone were selected. The time of incubation of anti-testosterone onto protein A-MBs was also optimized. Current increased for the first 10 min and then levelled off up to 90 min, the longest time tested. So, 10 min was selected as the incubation time to be used.

In order to perform the competitive assay, testosterone–HRP conjugate was used. The conjugate concentration was optimized by testing the amperometric response of different immunosensors incubated with testosterone–HRP in the 0–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range. The obtained results (Figure S4, suppl. material) revealed a high current increase for the lower testosterone–HRP concentrations up to 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A slight increase was observed between 0.1 and 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a plateau was reached for higher testosterone–HRP concentrations. This latter concentration corresponded likely to over-saturation of the immobilized antibodies. In order to select the most appropriate conjugate concentration to allow an adequate competition between testosterone and testosterone–HRP for the anti-testosterone binding sites, the responses obtained with immunosensors that were incubated with 0.1 and 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP and without and with 0.01 and 0.1 ng/mL testosterone were measured. As Table 1 shows, noticeable current changes with respect to zero signal were obtained in the presence of the analyte when using 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ conjugate, indicating a significant extent of the competition process. However, no significant changes were observed for the same testosterone concentrations when 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP was employed. This was expected as a higher conjugate concentration in solution requires a higher testosterone concentration for effective displacement in the competitive assay. These results led us to select 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

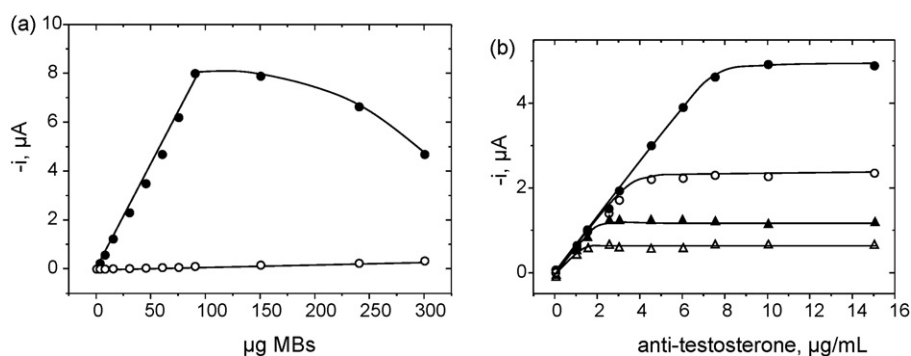


Fig. 2. (a) Effect of MBs loading onto SPCE on current without (○) and with 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-testosterone and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP (●); (b) Effect of anti-testosterone loading using: 7.5 (Δ); 15 (▲); 30 (○), and 60 μg MBs (●); 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ testosterone–HRP; 0.01 M PBS pH 7.0; $E = -0.20$ V.

Table 1

Amperometric responses obtained with disposable immunosensors using different testosterone–HRP conjugate concentrations in the absence and in the presence of testosterone.

Testosterone, ng/mL	0.1 µg/mL Test-HRP		0.6 µg/mL Test-HRP	
	–i, µA	%	–i, µA	%
0	0.71 ± 0.03	100	1.22 ± 0.02	100
0.01	0.54 ± 0.02	76	1.18 ± 0.03	97
0.1	0.39 ± 0.02	55	1.21 ± 0.02	99

testosterone–HRP as the appropriate concentration to achieve high sensitivity.

The time of incubation for the immunoassay was also evaluated over the 0–90 min range. The current increased sharply up to 45 min and then levelled off. Therefore, a time of 45 min was selected to allow the competitive assay between testosterone and testosterone–HRP.

3.2. Analytical characteristics for testosterone determination

The calibration plot for testosterone using the optimized experimental conditions is displayed in Fig. 3. The concentration range tested was 10^{-5} to 10^3 ng/mL, and the linear range ($r=0.995$) was between 5×10^{-3} and 50 ng/mL. The current vs. testosterone concentration curve was fitted by non-linear regression. The adjusted equation ($r=0.999$) was:

$$i = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + EC_{50}/x} + i_{\min}$$

where i_{\max} and i_{\min} were the maximum and minimum current values of the calibration graph: $0.702 \pm 0.006 \mu\text{A}$ and $0.01 \pm 0.01 \mu\text{A}$, respectively. The EC_{50} value (testosterone concentration for a 50% of competition) was 0.25 ± 0.04 ng/mL, and the Hill slope was $h = -0.41 \pm 0.02$. This low h value agrees with the wide linear range of concentrations (more than four orders of magnitude) that can be determined (Tijssen, 1985).

The limit of detection was calculated from the equation (Conneely et al., 2007):

$$LOD = EC_{50} \left(\frac{i_{\max} - i_{\min}}{i_{\max} - i_{\min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

where s is the standard deviation of the zero value (current value without testosterone), calculated from five repetitive measurements. The mean i value $\pm s$ was $0.70 \pm 0.03 \mu\text{A}$, with a relative standard deviation of 3.6%. Thus, a LOD of 1.7 pg/mL testosterone was calculated. A comparison of these analytical characteristics with those reported for the determination of testosterone using

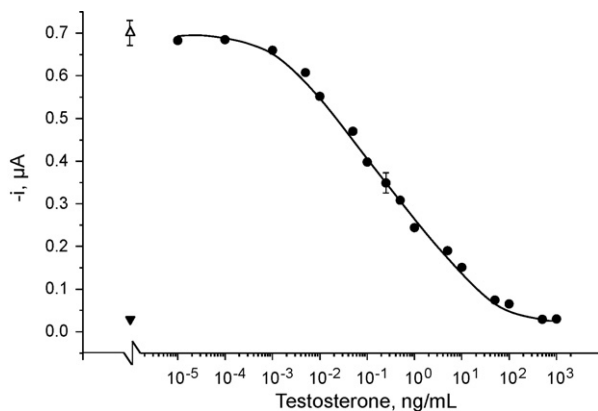


Fig. 3. Calibration plot for testosterone: (Δ) zero (without testosterone); (▼) blank (without testosterone–HRP).

Table 2

Interference from steroid hormones with a similar structure to that of testosterone at the testosterone–HRP/anti-testosterone/MBs immunosensor. Values are expressed as the current percentage measured with respect to 0 ng/mL testosterone (100%).

Compound	Concentration, ng/mL		
	10	100	1000
Epitesterone	100.1 ± 1.4	97.7 ± 0.9	98.9 ± 1.9
19-Nortestosterone	35.0 ± 1.2	17.2 ± 1.2	5.4 ± 1.0
17α-Methyl testosterone	98.1 ± 1.7	99.4 ± 1.9	99.9 ± 1.2
β-Estradiol	77.2 ± 1.2	35.4 ± 2.3	15.2 ± 1.6
Progesterone	98.9 ± 2.1	100.2 ± 0.8	83.1 ± 1.0
Cortisone	100.5 ± 1.4	100.2 ± 0.9	89.1 ± 1.4
Corticosterone	100.6 ± 2.0	99.9 ± 1.4	100.3 ± 0.5
Cortexolone	100.5 ± 1.0	97.7 ± 0.8	91.8 ± 2.0

other biosensing approaches is made in Table S1 of supp. information. As it can be deduced from the collected data, a remarkable lower detection limit can be achieved with the immunosensor design proposed in this work.

The repeatability and reproducibility of the measurements performed with the immunosensor were also checked. Amperometric measurements were done for 0, 0.25 and 500 ng/mL testosterone with five immunosensors prepared simultaneously for each testosterone concentration and using the same solutions of antibody, conjugate and HQ. The RSD values ($n=5$) were 3.6, 4.5 and 5.2% for 0, 0.25 and 500 ng/mL testosterone, respectively. Amperometric measurements were also carried out with five immunosensors prepared in 5 different days and using different prepared antibody, testosterone–HRP and HQ solutions. The RSD values were 5.2, 6.9 and 8.6%, respectively. These results show a good repeatability and reproducibility of the amperometric measurements made with the disposable immunosensor. As expected, a lower precision was found for the highest concentration of testosterone tested (500 ng/mL), which is likely due to the low current value measured (<30 nA) for such concentration.

The stability of testosterone–HRP/antibody/MBs conjugates was evaluated by preparing on the same day different eppendorf tubes containing these conjugates in 0.1 M PBS of pH 7.0, and stored at 4 °C. Each prepared conjugate, without testosterone, was used to measure the current as indicated above. The initial response could be maintained within $\pm 3 \times$ the standard deviation of the measurements ($n=5$) carried out on the same day, for 4 days after the conjugates preparation. Furthermore, a parallel study was performed by preparing only anti-testosterone/MBs conjugates which were stored similarly. Then, each testing day, one prepared conjugate was incubated into a recent solution of testosterone–HRP and used to measure the current as indicated above. In this case, the response obtained remained within $\pm 3s$ for at least 25 days (no longer times were assayed) indicating a high stability of the antibody-modified MBs conjugates, which can be prepared and stored for further incubation with fresh testosterone–HRP solution when the immunoassay is want to be realized.

3.3. Cross-reactivity

Various steroid hormones of interest in doping control for humans, structurally related with testosterone: epitestosterone, 19-nortestosterone, 17α-methyl testosterone, β-estradiol, progesterone, cortisone, corticosterone and cortexolone, were checked as potential interferents. Cross-reactivity was calculated from the currents measured in 0.1 M PBS pH 7.0 using interferent/testosterone–HRP/anti-testosterone/MBs conjugates prepared for different interferent concentrations. As can be observed in Table 2, only 19-nortestosterone and β-estradiol pro-

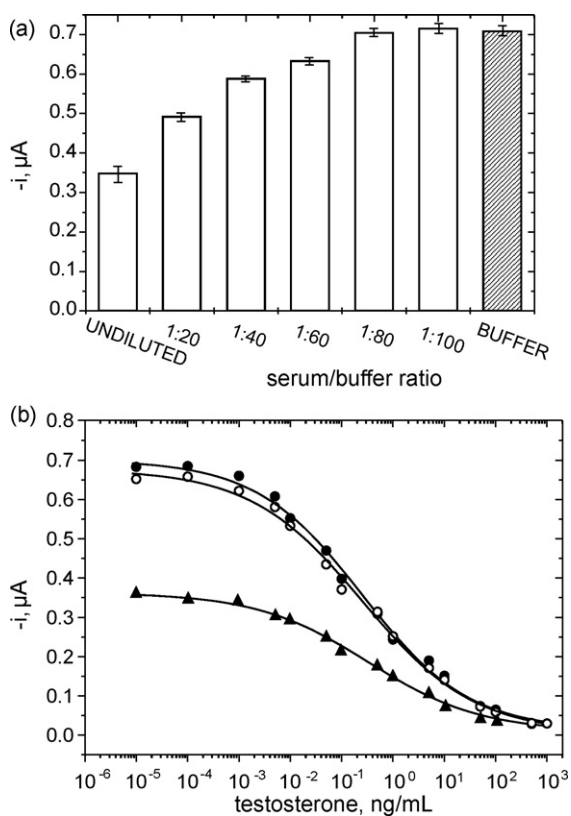


Fig. 4. (a) Evaluation of matrix effects from human serum in the testosterone determination; (b) calibration graphs for testosterone in undiluted human serum (▲); 1:80 (v/v) diluted human serum/PBS (○); PBS (●).

duced a significant interference. Concerning 19-nortestosterone, this could be expected because its structure differs from that of testosterone only in a methyl group at the C-19 position, the D rings of both steroids being identical. Regarding β -estradiol, this compound is the product of the testosterone aromatization reaction, and its structure is also very similar to that of testosterone. It is important to remark that epitestosterone did not interfere at any assayed concentration in spite of this compound only differs from testosterone in the orientation of the hydroxy group at the C-17 position. Therefore, the selected antibody can discriminate on the basis of orientation at that position. **Figure S5 suppl. material** shows the cross-reactant response curves for 19-nortestosterone and β -estradiol which are almost parallel to the standard testosterone curve. The cross-reactivity (%CR), calculated from the EC_{50} values of individual steroids, were 10.4 for 19-nortestosterone and 0.8 for β -estradiol. The other steroid hormones tested exhibited %CR lower than 0.025 since all of them did not reach the EC_{50} value even at a 1000 ng/mL concentration level. Although it was not experimentally confirmed, a similar cross-reactivity to that observed for 19-nortestosterone can be expected for similar steroid hormones such as keto-nortestosterone, while considering the reasoning made for epitestosterone, a very low cross-reactivity would be expected for an hormone such as α -nortestosterone. These results reflect a fairly good selectivity of the developed immunosensor for testosterone against structurally related compounds.

3.4. Determination of testosterone in spiked human serum

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing a human serum spiked with

testosterone at two different concentration levels, 1 and 10 ng/mL. Firstly, the possibility of a matrix effect was evaluated by measuring a set of unspiked samples diluted with different volumes of PBS, and containing testosterone–HRP in a 1:9 (v/v) ratio. **Fig. 4a** shows that the strong matrix effect observed with undiluted samples was completely removed by dilution of serum with buffer at 1:80. As it is also shown in the figure, a higher dilution at 1:100 did not produce further improvement. Under these conditions, no sample treatment was needed to perform the immunoassay. Calibration graphs for testosterone in undiluted and 1:80 diluted sera are displayed in **Fig. 4b**. The curve obtained from the undiluted serum showed much lower current values for low testosterone concentrations than those measured in PBS. However, upon 1:80 dilution, the calibration graph is very similar to that obtained with testosterone standard solutions with a Hill slope value of -0.40 ± 0.03 .

The determination of testosterone in the spiked serum samples was accomplished by interpolation of current into the standard testosterone calibration plot. Samples prepared by 1:80 dilution of sera containing 1 and 10 ng/mL testosterone were analyzed by triplicate. Testosterone found was 0.012 ± 0.002 ng/mL and 0.126 ± 0.003 ng/mL showing mean recoveries of 96 ± 2 and $101 \pm 2\%$, respectively. These results show fairly well the usefulness of the developed immunosensor for the analysis of low testosterone concentrations in human sera with practically no sample treatment.

4. Conclusions

A disposable electrochemical immunosensor for testosterone prepared by coupling functionalized MBs, a direct competitive immunoassay with testosterone–HRP and amperometric transduction at a SPCE using H_2O_2 as enzyme substrate and HQ as mediator, has been developed. The immunosensor exhibits great analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable analyte concentrations, precision and inter-assay reproducibility. These characteristics are remarkably better than those reported with the few electrochemical immunosensors for testosterone appeared in literature. This good practical performance makes this magnetoimmunosensor an useful and affordable analytical tool for the rapid determination of testosterone in human serum samples.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-CO2-01 and CTQ2009-12650), and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642 (AVANSENS), is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bios.2010.07.060](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.060).

References

- Centi, S., Laschi, S., Mascini, M., 2007. *Talanta* 73, 394–399.
- Chen, H.X., Deng, Q.P., Zhang, L.W., Zhang, X.X., 2009. *Talanta* 78, 464–470.
- Conneely, G., Aherne, M., Lu, H., Guilbault, G.G., 2007. *Anal. Chim. Acta* 583, 153–160.
- Houtman, C.J., Sterk, S.S., van de Heijning, M.P.M., Brouwer, A., Stephany, R.W., van der Burg, B., Sonneveld, E., 2009. *Anal. Chim. Acta* 637, 247–258.
- Leinonen, A., Kuuranne, T., Kotiaho, T., Kostiaainen, R., 2004. *Steroids* 69, 101–109.
- Li, X.F., Ma, M., Cheng, A., Zheng, J., Tam, Y.K., 2002. *Anal. Chim. Acta* 457, 165–171.

- Lu, H., Kreuzer, M.P., Takkinen, K., Guilbault, G.G., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1756–1763.
- Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L., Palleschi, G., 2007. *Anal. Chim. Acta* 605, 111–129.
- Ruth, A., 2001. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15, 1–16.
- Saudan, C., Baume, N., Mangin, P., Saugy, M., 2004. *J. Chromatogr. B* 810, 157–164.
- Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. In: Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 15. Elsevier, Amsterdam, p. 414.
- Xiao, Y., Ju, H.X., Chen, H.Y., 1999. *Anal. Chim. Acta* 391, 73–82.
- Zacco, E., Adrian, J., Galve, R., Marco, M.P., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2184–2191.

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Dispersión de micropartículas magnéticas modificadas con proteína A (MBs-Prot A) 3 mg mL⁻¹: se prepara por dilución de 10 µL de la suspensión comercial (Dynabeads® Protein A, Dynal Biotech ASA, de 30 mg mL⁻¹) en 100 µL de disolución reguladora B&W 0.1 M de pH 8.2.
- Disolución de anti-testosterona 15 µg mL⁻¹: se prepara por dilución de 5 µL de la disolución comercial (murine monoclonal, East Coast Bio., de 3.74 mg mL⁻¹) en 1240 µL de disolución reguladora B&W 0.1 M de pH 8.2. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de testosterona – HRP 10 µg mL⁻¹: se prepara por dilución de 5 µL de la disolución comercial (Biospacific, de 1 mg mL⁻¹) en 500 µL de disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 6.8. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución de testosterona 5 mg mL⁻¹: se disuelven 5 mg de testosterona (Aldrich) en 1 mL de metanol (Scharlau). Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 6.8 conteniendo NaCl 0.138 M y KCl 0.0027 M.
- Disoluciones patrón de compuestos interferentes 5 mg mL⁻¹: se disuelven 5 mg del compuesto correspondiente en 1 mL de metanol (Scharlau). Se han estudiado epitestosterona (Sigma), cortisona (Sigma), corticosterona (Sigma), progesterona (Sigma), cortexolona (Sigma), β-estradiol (Sigma), 19-nortestosterona (Sigma) y 17-α-metiltestosterona (Sigma). Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 6.8 conteniendo NaCl 0.138 M y KCl 0.0027 M.
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.1 M: se preparada por dilución de 9 µL de H₂O₂ 35% (Scharlau) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1

M de pH 7.0. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.

- Disoluciones de mediadores 0.1 M: se han preparado disoluciones de de ferrocianuro (Sigma), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma), catecol (Fluka) e hidroquinona (Sigma), disolviendo la cantidad adecuada de los reactivos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0.
- Disolución patrón de hidroquinona 0.1 M: se disuelven 11 mg de hidroquinona (Sigma) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución reguladora B&W de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M y Tween 0.01 % de pH 8.2: se disuelve la cantidad adecuada de las sales y de detergente en agua desionizada. El pH se ajusta con NaOH 2 M.
- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M, NaCl 0.138 M y KCl 0.0027 M de pH 6.8: se disuelve la cantidad adecuada de las sales en agua desionizada. El pH se ajusta con NaOH 2 M.
- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M de pH 7.0: se disuelve la cantidad adecuada de las sales en agua desionizada. El pH se ajusta con NaOH 2 M.
- Disolución de trabajo para la determinación de testosterona: se ha empleado disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0 conteniendo la cantidad adecuada de hidroquinona para que la concentración final sea 0.8 mM.

2.1.2. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR

2.1.2.1. INMOVILIZACIÓN DE LA ANTI-TESTOSTERONA

En primer lugar, se procede a inmovilizar la anti – testosterona sobre la superficie de las micropartículas magnéticas modificadas con proteína A (MBs-Prot A). Para ello se toma una alícuota de 5 μL de una suspensión de MBs-Prot A de 3 mg mL^{-1} , se coloca en un tubo de microcentrífuga de 1 mL y se lava por duplicado con 100 μL de disolución reguladora B&W de fosfato de pH 8.2. Cada etapa de lavado consiste en la resuspensión de las partículas magnéticas en la disolución de lavado mediante agitación vigorosa durante 1 minuto seguido de la separación del sobrenadante, después de colocar el tubo en el concentrador de partículas Dynal MPC-S (Dynal Biotech ASA) durante 2 minutos, que es el tiempo recomendado en las especificaciones para asegurar que todas las partículas se encuentran fijadas por la acción del imán.

A continuación, se añade una alícuota de 50 μL de una disolución de anti-testosterona de $2.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada en tampón B&W de fosfato de pH 8.2, y se incuba a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 10 min en un incubador-agitador Optic Ivynem System (Comecta). Transcurrido el tiempo de incubación, el tubo se coloca en el concentrador de partículas magnéticas durante 2 minutos, se retira el sobrenadante y las partículas modificadas con anti-testosterona se lavan dos veces con 100 μL de disolución reguladora B&W de fosfato de pH 8.2 y otra vez más con 100 μL de disolución reguladora de fosfato de pH 7.0. Este proceso permite eliminar el anticuerpo no inmovilizado sobre las partículas magnéticas, quedando las partículas magnéticas preparadas para llevar a cabo el procedimiento de inmunoensayo.

2.1.2.2. PROCEDIMIENTO DE INMUNOENSAYO

Para llevar a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo simultaneo, las partículas magnéticas modificadas con anti-testosterona se resuspenden en 50 μL de una disolución mezcla de testosterona – HRP (concentración final de $0.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) y testosterona (o muestra) en una proporción 1:9 (v/v), y se incuban a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 45 minutos. Seguidamente el tubo se coloca en el concentrador de partículas durante 2

minutos, se retira el sobrenadante, y se lava dos veces con 100 μL de disolución reguladora de fosfato de pH 7.0 para eliminar las especies no enlazadas.

Finalmente, el conjugado testosterona – HRP/testosterona – anti-testosterona – Prot A-MBs se resuspende en 45 μL de la disolución de trabajo y se inmoviliza, inmediatamente antes de la medida, sobre un SPCE con ayuda de un imán de neodimio (AIMAN GZ) colocado debajo del mismo.

En la *Figura 101* se muestra esquematizado el proceso de modificación de las partículas magnéticas, así como la reacción enzimática que tiene lugar al adicionar el sustrato de la peroxidasa de rabano.

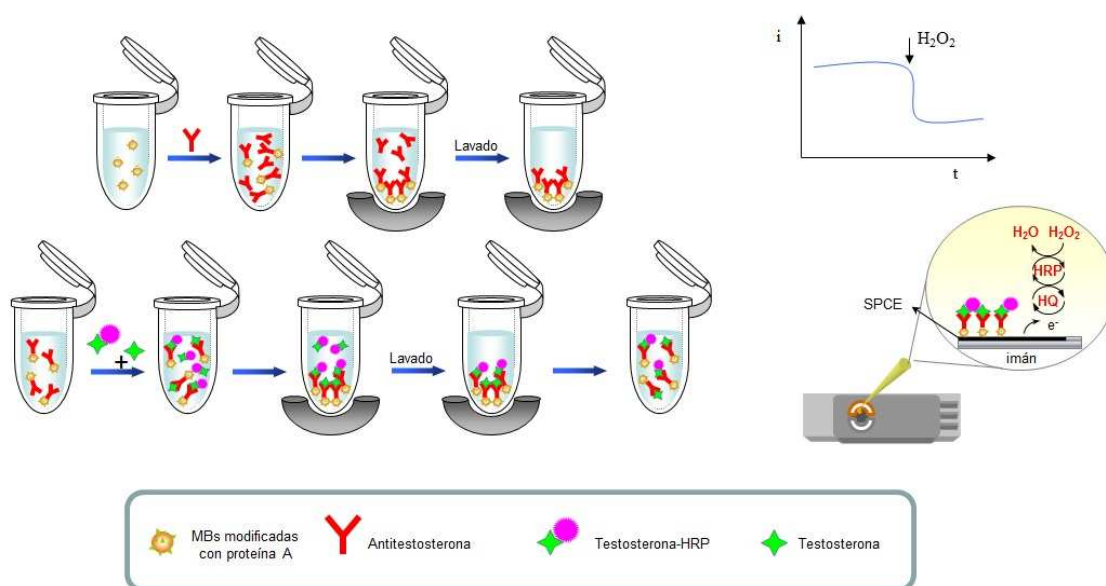


Figura 101. Modificación de las micropartículas magnéticas y detección.

2.1.3. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

En la *Figura 102* se representa el sistema empleado en los diferentes experimentos electroquímicos. Las medidas amperométricas y voltamperométricas se han realizado empleando un potenciostato Eco Chemie Autolab PSTAT 10 equipado con el módulo EDC y controlado mediante el software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System). Además, se han empleado electrodos desechables serigrafiados de carbono DRP-110 (Dropsens, con un diámetro de 4 mm y dimensiones 3.4 x 1.0 x 0.05 cm), que incluyen un electrodo de pseudoreferencia de plata y un

electrodo auxiliar de carbono. La interfase entre los electrodos serigrafiados y el potenciostato consiste en un conector DRP–CAC (Dropsens).

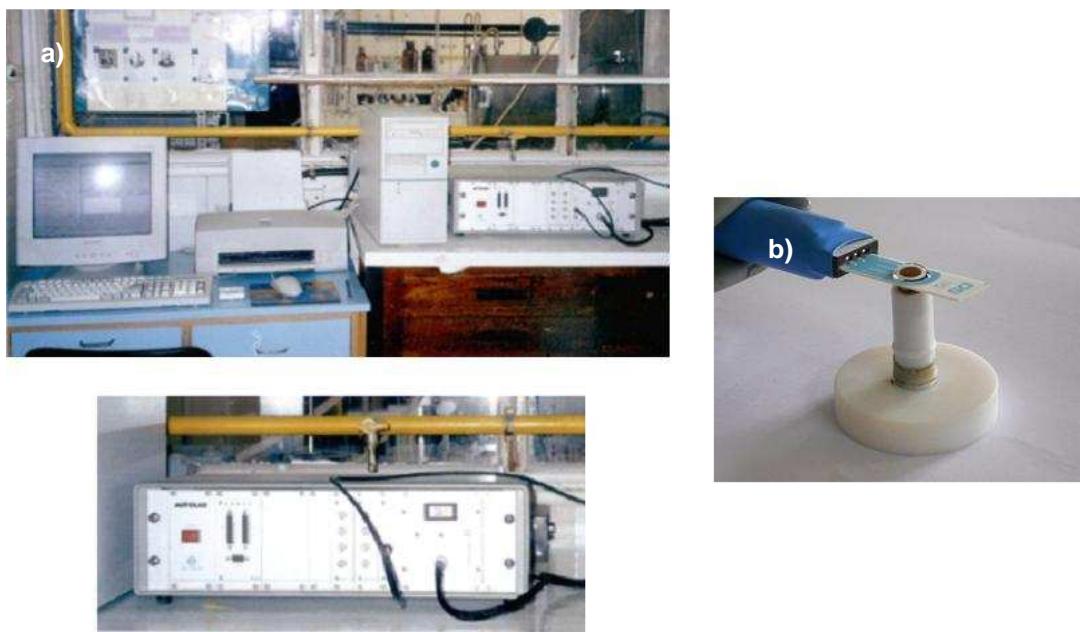


Figura 102. a) Potenciostato Eco Chemie Autolab PSTAT 10 y b) sistema electrónico empleado para las medidas electroquímicas.

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica y amperometría en disoluciones agitadas.

2.1.3.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Para obtener las curvas intensidad – potencial, un volumen homogéneo de 45 μL de la disolución reguladora, conteniendo el conjugado inmunológico, H_2O_2 y el mediador correspondiente, se inmoviliza sobre el SPCE cubriendo los electrodos de trabajo, pseudoreferencia y auxiliar a modo de célula electroquímica. Tras seleccionarse los potenciales inicial, de retorno y final, así como la velocidad de barrido, se procede al registro del voltamperograma cíclico correspondiente.

2.1.3.2. AMPEROMETRÍA

Para obtener los amperogramas, un volumen homogéneo de 45 μL de la disolución de trabajo, que contiene el conjugado inmunológico, se inmoviliza sobre el SPCE cubriendo los electrodos de trabajo, pseudoreferencia y auxiliar a modo de

célula electroquímica. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se adiciona una alícuota de 5 μL de una disolución de H_2O_2 de concentración adecuada, y se registra la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo hasta que alcanza el estado estacionario. El valor de la corriente en estado estacionario se relaciona con la variable estudiada.

2.1.4. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

El inmunosensor desarrollado se ha empleado para la determinación de testosterona en una muestra de suero humano a la que se añadió el analito a los niveles de concentración de 1 y 10 ng mL^{-1} . Con este fin, el suero sólido comercial (Sigma) se reconstituye en 1 mL de la disolución de testosterona correspondiente, se mezcla cuidadosamente hasta su total disolución, se alicuota y se congela a $-40\text{ }^\circ\text{C}$.

2.1.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para la determinación de testosterona en suero por amperometría empleando el inmunosensor desarrollado, solo se requiere una dilución previa de la muestra. De este modo se diluyen 10 μL de suero enriquecido con disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 6.8 hasta un volumen final de 800 μL .

A continuación se mezclan 45 μL de la muestra de suero diluida y 5 μL de la disolución de testosterona–HRP (concentración final de $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) y, posteriormente, las partículas magnéticas modificadas con anti-testosterona se resuspenden en 50 μL de esta mezcla siguiendo el procedimiento de inmunoensayo descrito en el *Apartado 2.1.2.2.*

2.1.4.2. OBTENCIÓN DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

La determinación de testosterona se realiza mediante amperometría, aplicando el potencial deseado. Para ello, el conjugado inmunológico testosterona–HRP/testosterona–anti-testosterona–Prot A-MBs, resuspendido en 45 μL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0 que contiene hidroquinona 0.8 mM, se

inmoviliza sobre el SPCE cubriendo los electrodos de trabajo, pseudoreferencia y auxiliar a modo de célula electroquímica, y se aplica un potencial de -0.2 V.

En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de una disolución patrón de H_2O_2 de 5 mM, monitorizándose la intensidad de corriente de reducción de la quinona generada en la reacción enzimática que se produce en la superficie del inmunosensor, la cual está directamente relacionada con la cantidad de complejo [antitestosterona – testosterona-HRP] formado, y que a su vez es inversamente proporcional a la concentración de testosterona presente en la muestra.

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del mismo modo que en la preparación del inmunosensor anterior, en primer lugar se seleccionó el mediador redox más adecuado para obtener la respuesta electroquímica de mejores características sobre la superficie del SPCE utilizado. Para ello se estudió el comportamiento voltamperométrico de diferentes disoluciones que contenían ferrocianuro, hidroquinona, catecol o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina junto con el conjugado enzimático testosterona-HRP. Como se observa en la *Figura 103*, el empleo de hidroquinona asegura la mayor actividad electrocatalítica, indicada por un aumento considerable de la corriente catódica y una disminución del pico anódico.

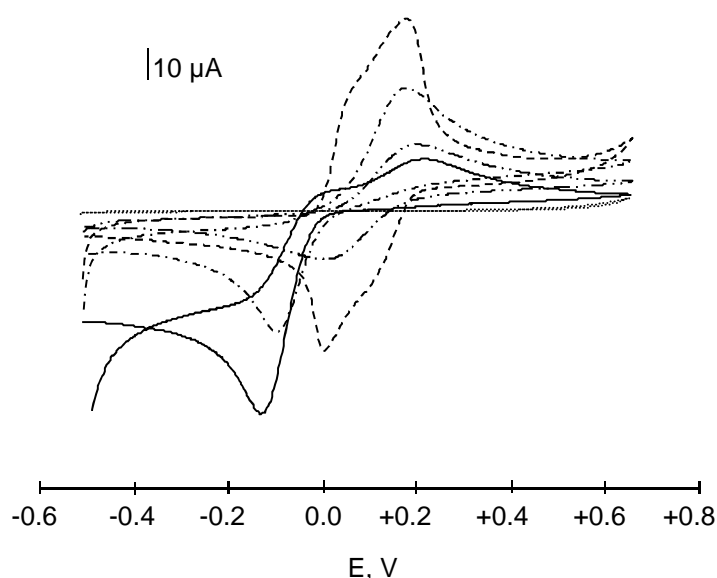


Figura 103. Voltamperogramas cíclicos sobre SPCE de disoluciones 1.0 mM de: ferrocianuro (— · — · —), hidroquinona (—), catecol (— · —) y TMB (- - - -); testosterona-HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; H_2O_2 5 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7.0; $v = 100 \text{ mV/s}$.

Una vez seleccionado el mediador, se eligió el potencial de medida de la reducción de la p-benzoquinona generada en la reacción enzimática. Para ello, se estudió la variación de la respuesta amperométrica del inmunosensor completo con el potencial aplicado, en el intervalo de +0.05 a -0.3 V (*Figura 104*). Como puede apreciarse, la magnitud de la corriente catódica para el peróxido de hidrógeno aumenta rápidamente cuando el potencial varía desde 0.00 a -0.15 V, permaneciendo

prácticamente constante para potenciales más negativos. Sin embargo, considerando el valor medio y la desviación estándar de las medidas de corriente obtenidas para un potencial de -0.15 V, resulta una desviación estándar relativa del 5.4 %, mientras que la desviación estándar relativa obtenida cuando se aplica un potencial de detección de -0.2 V corresponde a un 2.2 %. Teniendo en cuenta que los SPCEs emplean un electrodo de pseudoreferencia, y con objeto de conseguir una detección sensible y precisa, y de minimizar el número de interferentes potenciales capaces de ser reducidos en la superficie del electrodo, se seleccionó un potencial de trabajo de -0.2 V para estudios posteriores.

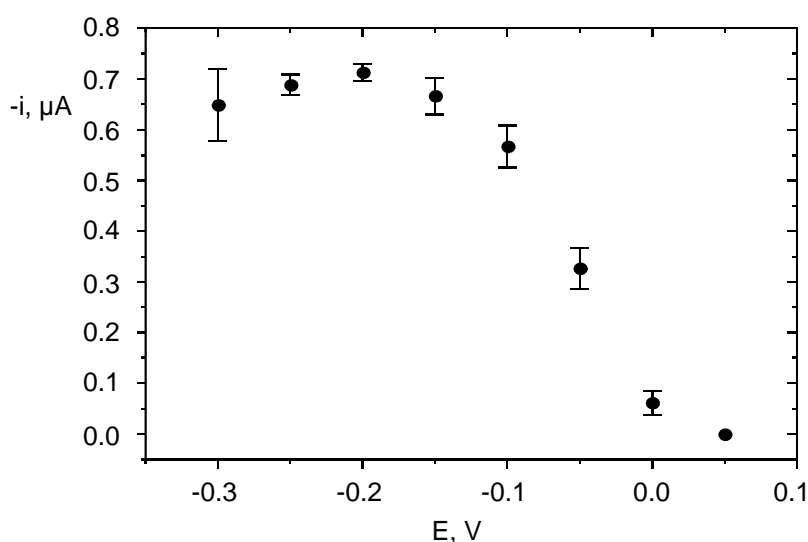


Figura 104. Influencia del potencial aplicado sobre la respuesta del inmunosensor; testosterona-HRP $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; H_2O_2 5 mM; HQ 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0. Barra de error correspondiente a 3s (n=3).

Antes de proceder a la optimización de las demás variables experimentales, se comprobó la fiabilidad del ensayo propuesto comparando la señal de reducción obtenida para el H_2O_2 antes y después de la interacción del anticuerpo con la testosterona-HRP. En este ensayo, la HQ presente en la célula electroquímica media la reducción catalítica del H_2O_2 producida por la enzima HRP. Así, la reducción electroquímica de la p-benzoquinona generada en la reacción enzimática se puede medir a un potencial determinado, siendo la señal obtenida directamente proporcional

a la cantidad de testosterona-HRP inmovilizada. Tal y como se muestra en la *Figura 105*, cuando se realiza el proceso en ausencia de testosterona-HRP no se observa respuesta amperométrica significativa al añadir la disolución de H_2O_2 a la superficie del electrodo modificado, comprobándose que la señal obtenida tras ocurrir la interacción anticuerpo-antígeno marcado era significativamente superior. Estos resultados ponen de manifiesto que el ensayo propuesto es adecuado para la detección electroquímica de testosterona.

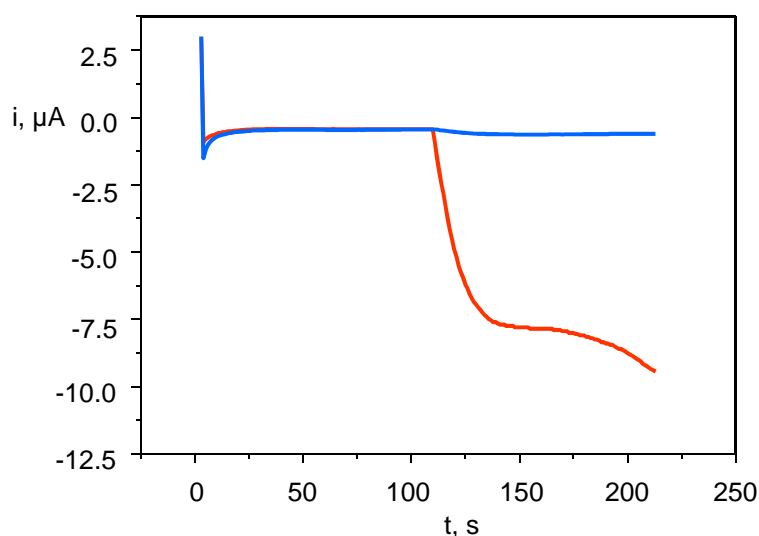


Figura 105. Señales amperométricas para H_2O_2 5 mM sobre: (—) SPCE/MBs-anti-testosterona; (—) SPCE/MBs-anti-testosterona-testosterona-HRP. 90 μg MBs; anti-testosterona 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$; testosterona-HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.2$ V.

2.2.1. PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR

2.2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Con el fin de obtener la mejor señal electroquímica se optimizaron las siguientes variables:

- Las condiciones de inmovilización de la anti-testosterona sobre las micropartículas modificadas con proteína A: cantidad de micropartículas, concentración de anti-testosterona y tiempo de incubación micropartículas-anticuerpo.

- El procedimiento de inmunoensayo: concentración de testosterona-HRP y duración del proceso.
- Las condiciones experimentales de la detección: concentración de peróxido de hidrógeno y concentración del mediador hidroquinona.

Inmovilización de anti-testosterona sobre las partículas magnéticas

En la *Figura 2a* del artículo (pág. 519 del mismo) se muestra la dependencia de la señal amperométrica con la cantidad de partículas magnéticas modificadas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo mediante atracción magnética, empleando anti-testosterona $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ y testosterona-HRP $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como puede observarse, la señal amperométrica aumenta linealmente hasta una cantidad de partículas de $90 \mu\text{g}$, debido a que se va inmovilizando mayor cantidad de anticuerpo a medida que aumenta la superficie disponible de MBs. Sin embargo, para cantidades superiores, se observa una disminución de la señal, probablemente debido a que la cantidad de anti-testosterona ensayada ya ha quedado totalmente inmovilizada sobre las MBs, suponiendo el exceso de partículas magnéticas un impedimento físico a la transferencia de electrones. Además, se evaluó la posible existencia de adsorciones inespecíficas de testosterona-HRP sobre la superficie de las partículas magnéticas en ausencia de anti-testosterona. Tal y como puede observarse en la *Figura 2a* del artículo, cuando se realiza el proceso en ausencia de anti-testosterona se produce un ligero aumento de la señal inespecífica a medida que aumenta la cantidad de partículas magnéticas, lo cual se debe a que a medida que aumenta el número de MBs, mayor es la superficie disponible para la adsorción inespecífica de testosterona-HRP en ausencia de anti-testosterona. Sin embargo, es importante destacar que esta señal debida a las adsorciones inespecíficas es insignificante comparada con la señal específica obtenida en presencia de anticuerpo. La demostrada ausencia de adsorciones inespecíficas de testosterona-HRP sobre las MBs sin necesidad de bloqueo, se debe a que la proteína A tiene mucha más afinidad por la región constante del anticuerpo que por el conjugado enzimático.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, a continuación se estudió la influencia de la concentración de anti-testosterona, en el intervalo $0 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$,

empleando cantidades de MBs comprendidas entre 7.5 y 60 μg , y testosterona-HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como puede observarse en la *Figura 2b* del artículo (pág. 519 del mismo), la corriente en estado estacionario aumenta en todos los casos con la concentración de anticuerpo hasta alcanzar la saturación de la superficie de las partículas magnéticas, siendo tanto menor la concentración de anticuerpo necesaria para alcanzar esta saturación, cuanto menor es la cantidad de partículas magnéticas. Teniendo en cuenta la teoría, que indica que la disminución de la concentración de anticuerpo conduce a una mayor sensibilidad, ya que se requiere menos analito para alcanzar un nivel de referencia constante [Ruth, 2001], y como compromiso entre una señal de suficiente magnitud y una cantidad de partículas magnéticas pequeña, se seleccionaron 15 μg de MBs y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-testosterona como concentraciones óptimas. Además, el bajo coste también puede ser un factor a favor del uso de concentraciones bajas de anticuerpo y partículas magnéticas.

Por otro lado, en la *Figura 106* se muestra la influencia del tiempo de incubación de la anti-testosterona con las partículas magnéticas modificadas con proteína A.

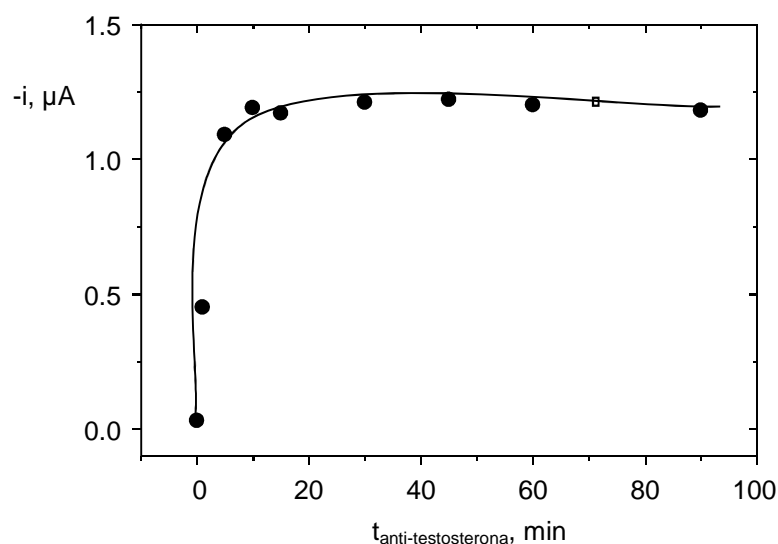


Figura 106. Influencia del tiempo de incubación de la anti-testosterona sobre la respuesta del inmunosensor; H_2O_2 5 mM; HQ 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

Como puede observarse, la corriente aumenta durante los 10 primeros minutos, manteniéndose constante para tiempos superiores, por lo que se deduce que este tiempo es suficiente para la completa saturación de las partículas magnéticas con el anticuerpo.

Procedimiento de inmunoensayo

Como ya se ha indicado, para la determinación de testosterona se empleó un formato tipo competitivo en el que el analito (testosterona) y el conjugado testosterona-HRP compiten por los sitios de unión de la anti-testosterona, que se encuentra en concentración limitante inmovilizada sobre las partículas magnéticas. En la *Figura 107* se muestra la dependencia de la señal amperométrica con la concentración de testosterona-HRP, estudiada en el intervalo 0 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como puede observarse, la señal aumenta de forma pronunciada desde 0 hasta 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aumentando posteriormente de forma ligera hasta 0.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, donde permanece prácticamente constante, probablemente debido a que se ha alcanzado la sobresaturación de los sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados.

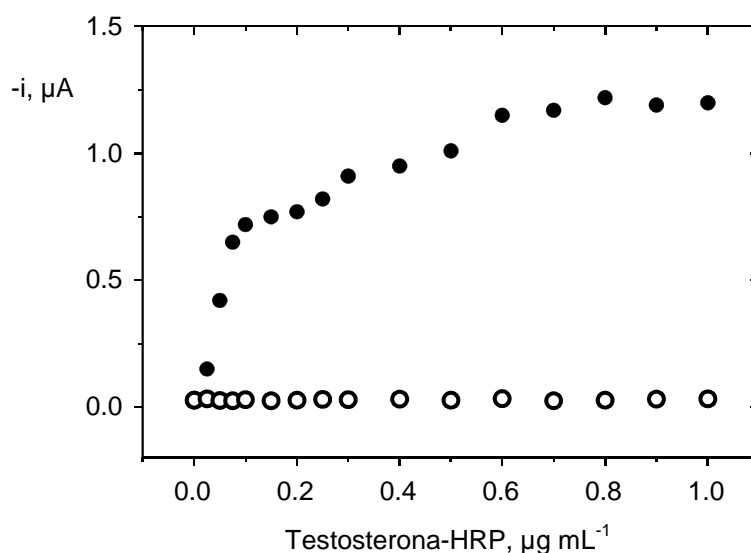


Figura 107. Influencia de la concentración de testosterona-HRP sobre la respuesta de SPCEs modificados con 15 μg de MBs sin (○) y con anti-testosterona 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (●); H_2O_2 5 mM; HQ 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

Como en el inmunosensor anterior, con el fin de obtener la mayor sensibilidad en el proceso de competición, se evaluó la concentración de conjugado enzimático más apropiada, incubando las partículas magnéticas modificadas con anti-testosterona en disoluciones de testosterona-HRP de concentración 0.1 y 0.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en ausencia y en presencia de 0.01 y 0.1 ng mL^{-1} de analito. Como se muestra en la *Tabla 1* del artículo (pág. 520 del mismo), cuando se emplea una concentración de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se obtienen cambios significativos de corriente en presencia de testosterona, con respecto a las obtenidas en su ausencia, lo cual indica que el proceso de competición ha ocurrido en mayor o menor extensión (un 76% y un 55% para concentraciones de testosterona de 0.01 y 0.1 ng mL^{-1} , respectivamente). Por el contrario, para una concentración de testosterona-HRP 0.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no se observan cambios significativos de corriente debido a que la concentración de conjugado es tan elevada que no permite la competición para los niveles de testosterona ensayados. Finalmente, para llevar a cabo el ensayo competitivo se seleccionó una concentración de conjugado de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Además, con objeto de que el proceso de competición transcurriese en la mayor extensión posible, se estudió la influencia del tiempo de incubación de las micropartículas modificadas con anti-testosterona en el conjugado enzimático, siendo suficiente un tiempo de 45 min para obtener la máxima eficiencia del proceso (*Figura 108*).

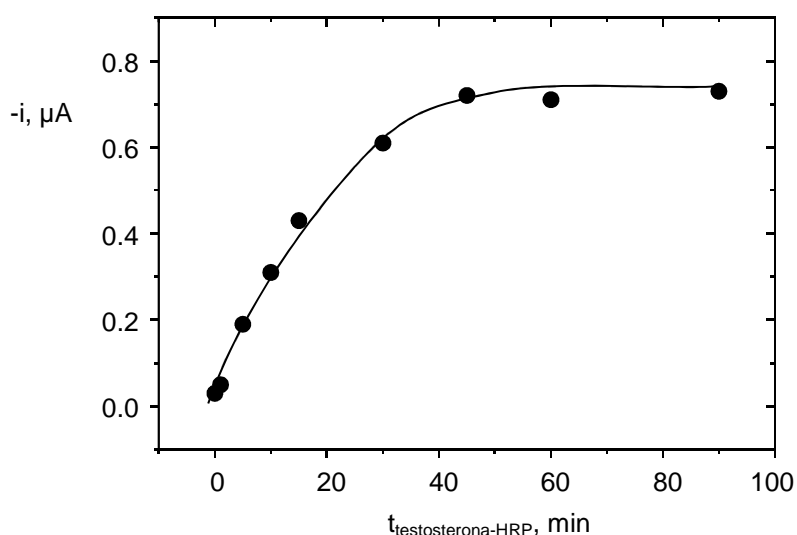


Figura 108. Influencia del tiempo de incubación de la testosterona-HRP sobre la respuesta del inmunosensor; H_2O_2 5 mM; HQ 1 mM en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

Detección

Para investigar la dependencia de la señal electroquímica obtenida con la concentración de sustrato empleada en el ensayo, se varió la concentración de H_2O_2 entre 0.01 y 5 mM empleando las variables optimizadas y manteniendo fija la concentración de mediador. Como puede observarse en la *Figura 109a*, la corriente en estado estacionario aumenta con la concentración de sustrato hasta 0.5 mM. Teniendo en cuenta que elevadas concentraciones de H_2O_2 puede desnaturalizar la enzima HRP [Xiao, 1999], y con el fin de asegurar que la velocidad de la reacción enzimática sólo depende de la concentración de aquélla, se seleccionó una concentración de peróxido de hidrógeno 0.5 mM. Con respecto a la concentración de hidroquinona, se estudió su influencia en el intervalo de concentraciones de 0 a 2 mM con los resultados que aparecen en la *Figura 109b*. Como puede observarse, la intensidad de corriente catódica aumenta rápidamente con la concentración de mediador hasta 0.8 mM, permaneciendo constante para concentraciones superiores, por lo que este valor fue elegido para los estudios posteriores.

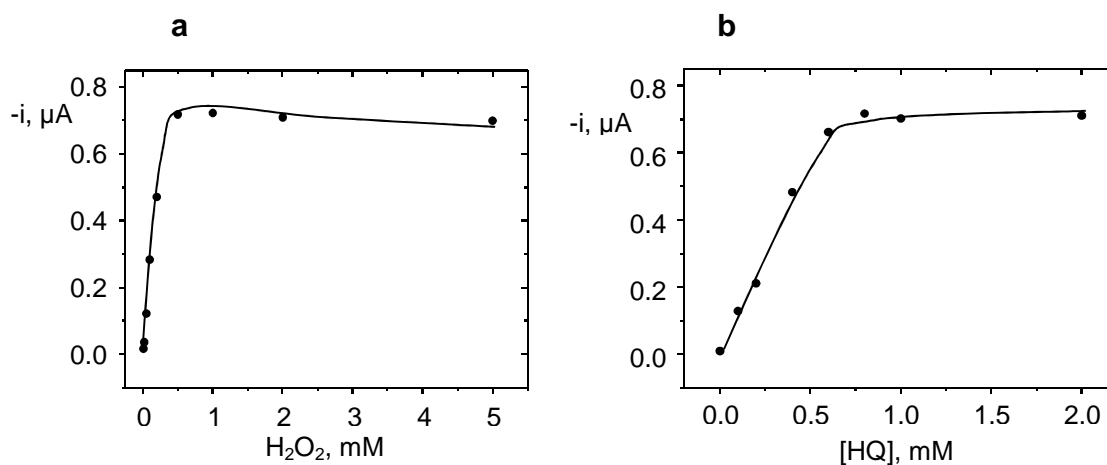


Figura 109. Influencia de la concentración de H_2O_2 (a) y de hidroquinona sobre la respuesta del inmunosensor; HQ 1 mM (a); H_2O_2 0.5 mM (b); en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

Por otro lado, la detección electroquímica se llevó a cabo a pH 7.0, al cual ha sido reportada la máxima actividad de la HRP empleando el sistema H₂O₂/HQ sobre electrodos serigrafados de carbono [Evtugyn, 2006].

En la *Tabla 15* se recogen las variables experimentales estudiadas y los valores seleccionados para trabajar con el inmunosensor competitivo desarrollado.

Tabla 15. Optimización de variables experimentales para la determinación de testosterona empleando el inmunosensor SPCE/MBs-anti-testosterona-testosterona-HRP.

Configuración	Variable experimental	Rango estudiado	Valor seleccionando
anti-testosterona-MBs/SPCE	MBs, µg	0 – 300	15
	anti-testosterona, µg mL ⁻¹	0 – 15	2.5
	t _{anti-testosterona} , min	0 – 90	10
	testosterona-HRP, µg mL ⁻¹	0 – 1	0.1
	t _{testosterona-HRP} , min	0 – 90	45
	H ₂ O ₂ , mM	0.01 – 5	0.5
	hidroquinona, mM	0 – 2	0.8
	E _{ap} , V	+0.05 – -0.3	-0.2

2.2.1.2. CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA

Empleando las condiciones experimentales previamente optimizadas, se construyó una curva de calibrado en el intervalo comprendido entre 10⁻⁵ y 10³ ng mL⁻¹ (*Figura 3* del artículo, pág. 520 del mismo), que al igual que en el inmunosensor anterior se ajusta (r=0.999) a una ecuación paramétrica típica de los formatos competitivos [Tijssen, 1985], siendo el intervalo lineal de 5·10⁻³ a 50 ng mL⁻¹ (r=0.995).

El valor de EC₅₀ obtenido fue de 0.25 ± 0.04 ng mL⁻¹, y la pendiente de Hill de -0.41 ± 0.02. Empleando la ecuación señalada anteriormente [Conneely, 2007], el límite de detección obtenido a partir de cinco calibrados fue de 1.7 ± 0.2 pg mL⁻¹ (intervalo de confianza calculado para un valor de significación de 0.05).

Si se comparan estas características con las obtenidas empleando el inmunosensor anterior, se observan notables mejoras, tanto en lo que se refiere al intervalo lineal, que se extiende ahora hasta concentraciones dos órdenes de magnitud menores,

como al límite de detección, que es 50 veces más bajo. Por otra parte, cuando la comparación se realiza con otros métodos basados en inmunosensores o inmunoensayos instrumentales para testosterona (*Tabla 16*), se aprecia que el intervalo lineal es el más amplio, extendiéndose hasta concentraciones más bajas, y que el límite de detección alcanzado es el menor. Estas mejoras se deben probablemente a la combinación del empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A, que permiten inmovilizar una elevada cantidad de conjugado con una adecuada orientación del anticuerpo, y la sensibilidad de la detección electroquímica mediada por la hidroquinona sobre el SPCE.

A modo de ejemplo, en la *Figura 110* se muestran las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor para distintos niveles de testosterona.

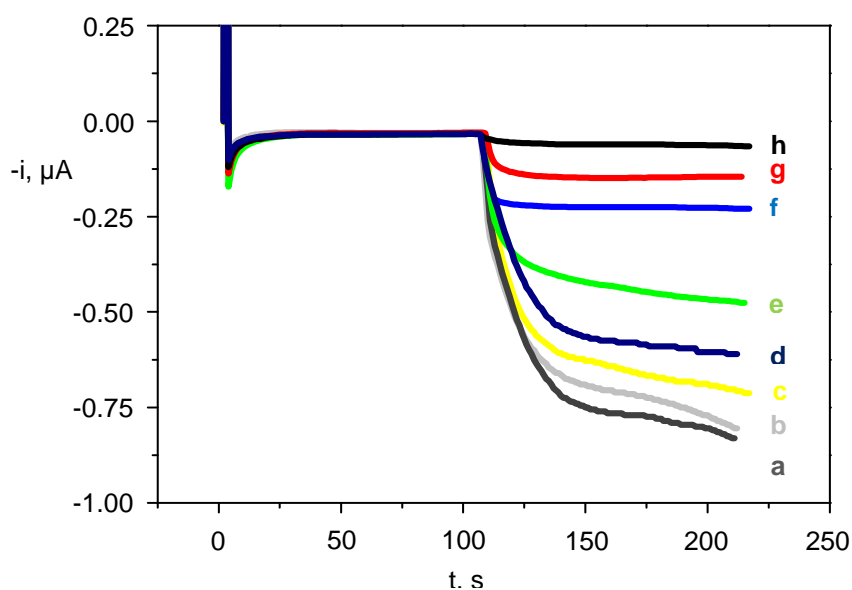


Figura 110. Señales amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado. Testosterona: (a) 0, (b) 10^{-4} , (c) 10^{-3} , (d) 10^{-2} , (e) 10^{-1} , (f) 1, (g) 10 y (h) 100 ng mL^{-1} .

Tabla 16. Características analíticas de algunos métodos de inmunoensayo e inmunosensores para testosterona.

Configuración	Intervalo lineal, ng/mL	LOD, pg/mL	EC ₅₀ , ng/mL	Ref.
Inmunosensor electroquímico basado en un ensayo competitivo entre testosterona-BSA y testosterona por fragmento anti-testosterona Fab; incubación con IgG-HRP; adiciones de H ₂ O ₂ y TMB; E _{ap} =100mV.	0.3-40	90 ± 13	2.7 ± 0.5	[Lu, 2007] _b
Inmunosensor electroquímico basado en un ensayo competitivo entre testosterona-BSA y testosterona por anti-testosterona; incubación con IgG-HRP; adiciones de H ₂ O ₂ y TMB; E _{ap} =100mV.	0.03-40	26	0.710	[Conneely, 2007]
Inmunosensor potenciométrico. Se miden los cambios de potencial después de la interacción anti- testosterona -testosterona. Electrodo: PVB/anti-testosterona/nanoalambres de Au/PtE.	1.2-83.5	100	-	[Liang, 2008]
Ensayo inmunocromatográfico competitivo con detección electroquímica sobre un electrodo de oro (microchip) empleando disoluciones de testosterona en continuo que contienen testosterona-HRP y FcOH.	1-625	-	-	[Inoue, 2007]
Ensayo competitivo entre testosterona-BSA y testosterona; incubación con IgG-HRP. Detección espectrofotométrica.	0.02-15.6	7.4 ± 2.9	0.14 ± 0.05	[Lu, 2006]
Análisis por SPR. Inmovilización de testosterona conjugada con oligoetilenglicol a nanopartículas de oro.	0.029-0.290	3.5	-	[Mitchell, 2009]
Electroforesis capilar con extracción por inmuoafinidad. Inmovilización de anti-epitestosterona en Sepharose 4B; separación of testosterona y epitestosterona por MEKC.	17-500	5000	-	[Chen, 2009] _b
Inmunosensor electroquímico basado en un ensayo competitivo entre testosterone-HRP y testosterone por anti-testosterona. Electrodo compósito: AuNPs/MWCNTs/teflón. Adiciones	0.1-10	85 ± 6	1.0 ± 0.2	<i>Este trabajo</i>
Inmunosensor electroquímico basado en un ensayo competitivo entre testosterone-HRP y testosterone por anti-testosterona; incubación con MBs-Prot A. Electrodo: SPCE. Adiciones H ₂ O ₂ , mediador HQ; E _{ap} =-200 mV	5x10 ⁻³ -50	1.7 ± 0.2	0.25 ± 0.04	<i>Este trabajo</i>

Abreviaturas utilizadas: AuNPs: nanopartículas de oro; BSA: albúmina de suero bovino; FcOH: ferrocenometanol; HQ: hidroquinona; IgG: inmunoglobulina G; LOD: límite de detección; MBs-Prot A: partículas magnéticas modificadas con proteína A; MEKC: cromatografía electrocinética capilar micelar; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple; SPCE: electrodos serigrafados de carbono; SPR: resonancia de plasmón superficial; TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

2.2.1.3. ESTABILIDAD

El hecho de que los inmunosensores basados en electrodos serigrafiados desechables requieran el uso de un nuevo electrodo para cada medida, hace de la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes inmunosensores fabricados de la misma manera, un aspecto esencial a evaluar con objeto de asegurar la utilidad práctica real de este diseño. Con el fin de llevar a cabo este estudio se investigaron, tal y como se describe en el artículo (pág. 520 del mismo), dos aspectos relacionados. En primer lugar, evaluó la reproducibilidad de las medidas efectuadas con cinco inmunosensores diferentes preparados simultáneamente para tres niveles de concentración de testosterona distintos (0, 0.25 y 500 ng mL⁻¹), empleando las mismas disoluciones de anticuerpo, conjugado enzimático y mediador, encontrándose valores de RSD del 3.6 %, 4.5 % y 5.2 %, respectivamente para cada uno de los niveles de testosterona ensayados. Por otra parte, se evaluó la reproducibilidad de las medidas efectuadas con cinco inmunosensores diferentes preparados en cinco días diferentes para tres niveles de concentración de testosterona distintos (0, 0.25 y 500 ng mL⁻¹), empleando distintas disoluciones de anticuerpo, conjugado enzimático y mediador, encontrándose valores de RSD del 5.2 %, 6.9 % y 8.6 %, respectivamente para cada nivel de concentración de testosterona.

Los resultados obtenidos confirman que el proceso de fabricación del inmunosensor es fiable, permitiendo así obtener respuestas amperométricas reproducibles con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera. Como era de esperar, los valores de las desviaciones estándar relativa obtenidas para los inmunosensores preparados en distintos días son mayores que las obtenidas con los inmunosensores preparados simultáneamente, lo que se debe principalmente a que se emplean distintas disoluciones de reactivo para su fabricación. Además, se puede observar que en ambos casos los peores resultados se obtienen para una concentración de testosterona de 500 ng mL⁻¹, lo cual se debe al bajo valor de corriente medido para dicha concentración de analito.

Por otro lado, también se evaluó la estabilidad de los conjugados utilizados para la preparación del inmunosensor. Para ello se prepararon el mismo día tubos Eppendorf

que contenían MBs/anti-testosterona/testosterona-HRP o MBs/antitestosterona en medio regulador fosfato de pH 7.0, que fueron almacenados a 4 °C.

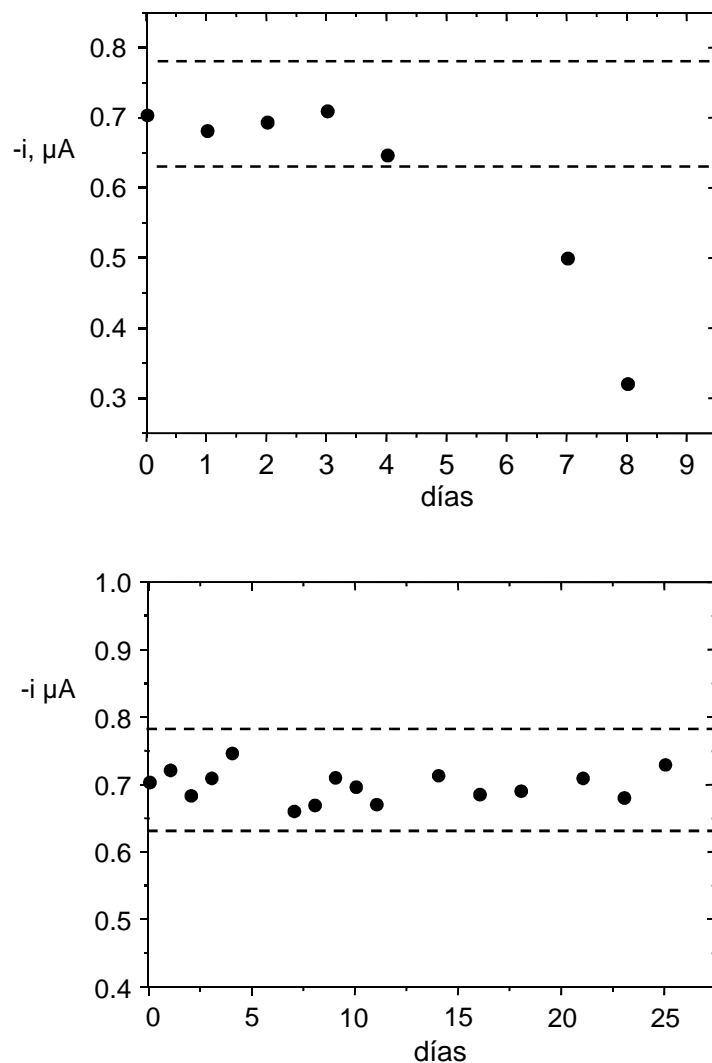


Figura 111. Diagramas de control construídos para los inmunosensores preparados con MBs/anti-testosterona/testosterona-HRP (*superior*) y con MBs/antitestosterona (*inferior*); H_2O_2 0.5 mM; HQ 0.8 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

Como se observa en la *Figura 111*, la respuesta inicial del inmunosensor preparado con los conjugados MBs/anti-testosterona/testosterona-HRP se mantiene dentro de los límites de control (± 3 veces la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día, $n=5$) durante 4 días después de su preparación. En el caso de los conjugados MBs/anti-testosterona, las medidas se realizaron después de su incubación

en la disolución correspondiente de testosterona-HRP, apreciándose que la respuesta se mantiene dentro de los límites de control durante al menos 25 días. La elevada estabilidad de este conjugado hace posible que pueda ser preparado y almacenado hasta el momento en que realice el inmunoensayo.

2.2.1.4. INTERFERENCIAS

Al igual que en el inmunosensor anterior, también se investigó el comportamiento del inmunosensor anti-testosterona/MBs/SPCE en presencia de distintas hormonas de interés en el área del dopaje, todas ellas estructuralmente relacionadas con la testosterona. Como se muestra en la *Figura 112*, en este caso el número de compuestos estudiados fue superior, incluyéndose la progesterona y algunos corticosteroides como la cortisona, la corticosterona y la cortexolona. En la *Tabla 2* del artículo (pág. 520 del mismo) se muestran los resultados obtenidos en presencia de interferentes a distintos niveles de concentración, expresados como el porcentaje de corriente medido con respecto a la corriente obtenida en ausencia de testosterona (100 %). Como puede observarse, solamente la 19-nortestosterona y el β -estradiol producen una interferencia significativa. En el caso de la 19-nortestosterona, estos resultados se pueden explicar como en el trabajo anterior teniendo en cuenta que su estructura difiere de la de la testosterona solamente en el grupo metilo de la posición C-19, siendo idénticos los anillos D de ambos esteroides. Por otro lado, el β -estradiol es producto de la reacción de aromatización de la testosterona, y su estructura es también muy similar a la de ésta. Al igual que en el inmunosensor anti-testosterona-AuNPs/MWCNTs/teflón, es importante destacar la ausencia de interferencia por parte de la epitestosterona, a pesar de que su estructura sólo difiere en la orientación espacial del grupo hidroxilo en la posición C-17, hecho que nuevamente se atribuye a la capacidad de discriminación de la anti-testosterona seleccionada en esa posición.

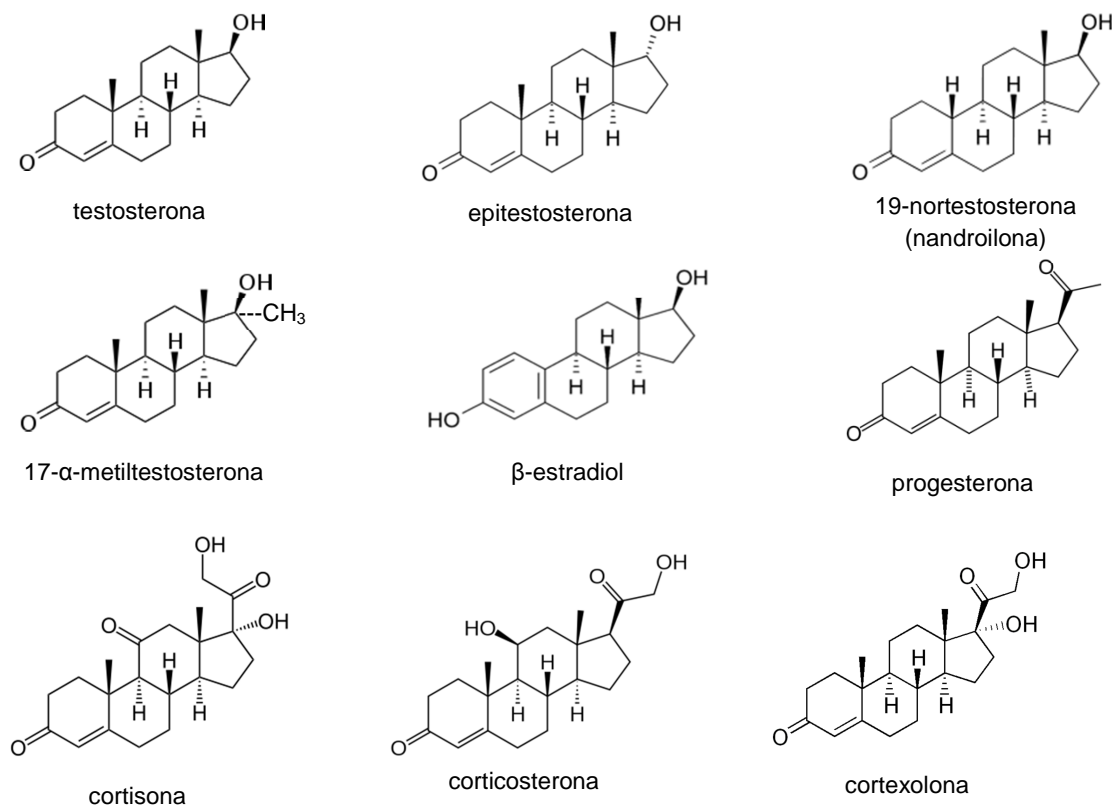


Figura 112. Estructura química de la testosterona y otras hormonas esteroideas estructuralmente relacionadas.

En la *Figura 113* se han representado los calibrados obtenidos para la 19-nortestosterona y el β -estradiol, observándose que son casi paralelos al obtenido con testosterona. Los valores de reactividad cruzada (%CR), obtenidos a partir de la expresión: $\%CR = [(EC_{50})_{analito}/(EC_{50})_{interferente}] \times 100$, son: 10.4 % para la 19-nortestosterona y 0.8 % para el β -estradiol. Es importante señalar que las demás hormonas estudiadas presentan valores inferiores al 0.025 % ya que ninguna de ellas alcanza el valor de EC_{50} de la testosterona incluso para un nivel de concentración de 1000 ng mL^{-1} . Los resultados obtenidos demuestran una buena selectividad del inmunosensor desarrollado para la testosterona frente a los compuestos estudiados cuando se emplea el anticuerpo monoclonal seleccionado.

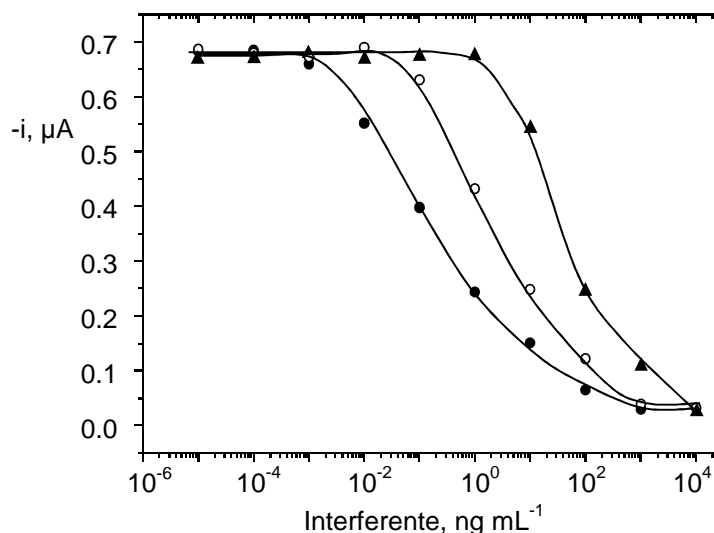


Figura 113. Curvas de reactividad cruzada para (o) 19-nortestosterona y (▲) β -estradiol; (●) calibrado de la testosterona; H_2O_2 0.5 mM; HQ 0.8 mM en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M a pH 7.0; $E_{ap} = -0.2$ V.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO ENRIQUECIDO

Como aplicación del inmunosensor desarrollado, se ha llevado a cabo el análisis de muestras de suero humano a las que se adicionó testosterona a dos niveles de concentración: 1 y 10 ng mL⁻¹.

En primer lugar se evaluó la existencia de efecto matriz, aplicando el procedimiento descrito en el *Apartado 2.1.4.* a la medida de muestras de suero en ausencia de testosterona. Como puede observarse en la *Figura 4a* del artículo (pág. 521 del mismo), la muestra sin diluir presenta una corriente amperométrica muy inferior al de la disolución reguladora. Sin embargo, a medida que aumenta el grado de dilución, la respuesta se incrementa, llegando a desaparecer el efecto matriz completamente al efectuar una dilución 1:80. A modo de ejemplo, en la *Figura 4b* (pág. 521 del artículo) se ha representado el calibrado obtenido con disoluciones patrón de testosterona, así como los correspondientes a la muestra de suero sin diluir y diluida 80 veces. La curva obtenida con el suero sin diluir exhibe corrientes amperométricas para concentraciones bajas de testosterona mucho menores que las obtenidas en PBS. Sin embargo, con una dilución 1:80 se obtiene una curva con una

pendiente de Hill de -0.40 ± 0.03 , que no difiere significativamente de la obtenida con disoluciones patrón para un nivel de significación de 0.05.

La determinación de testosterona en las muestras de suero proporcionó los resultados que aparecen resumidos en la *Tabla 17*. Siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 2.1.4.*, se han analizado distintas muestras de suero enriquecido con testosterona 1 y 10 ng mL⁻¹ (diez muestras de cada nivel de concentración), diluidas 80 veces en disolución reguladora de fosfato. Los intervalos de confianza se calcularon para un valor de significación de 0.05, obteniéndose valores de RSD inferiores al 10% para los dos niveles de enriquecimiento ensayados.

Tabla 17. *Determinación de testosterona en muestras de suero humano enriquecido.*

Muestra	Testosterona encontrada (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Testosterona adicionada (ng mL ⁻¹)	Recuperación (%)
1	0.96 ± 0.02	3.8	1.0	96 ± 2
2	10.1 ± 0.2	3.4	10.0	101 ± 2

Factor de dilución=80

La validación de los resultados obtenidos se ha realizado empleando el ensayo de hipótesis utilizando el método test de la *t* de Student. Para un nivel de concentración de 10 ng mL⁻¹ no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de testosterona adionada y la recuperada a un nivel de significación de 0.05. Además, en la Tabla se observan recuperaciones de (96 ± 2) % y (101 ± 2)%. Estos resultados demuestran el buen comportamiento del magnetoinmunsensor desarrollado para la determinación de testosterona en suero a los niveles de concentración normales en este tipo de muestras.

A partir de los resultados obtenidos y descritos en este Capítulo de esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- El electrodo compuesto de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y teflón combina las ventajas inherentes a los electrodos compósitos, como es la fácil regeneración de la superficie sensora mediante simple pulido, con las excelentes propiedades de ambos nanomateriales. Estas características han permitido construir un inmunosensor para testosterona por inmovilización directa de la anti-testosterona sobre la superficie del electrodo, siendo posible lograr una adsorción estable de las biomoléculas, así como una buena sensibilidad.
- El empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A permite llevar a cabo la inmovilización orientada de la anti-testosterona, así como separar las etapas de preparación y detección. Este hecho, unido a la utilización de electrodos serigrafiados de carbono han hecho posible la construcción de un magnetoinmunosensor desechable para testosterona, que presenta características analíticas muy mejoradas con respecto a otras configuraciones descritas en la literatura en términos de sensibilidad, selectividad, amplio intervalo lineal de concentración, precisión y reproducibilidad.

- Las metodologías desarrolladas constituyen una estrategia sencilla para la determinación del esteroide en muestras de suero humano.

- **[Carralero, 2006]:** Carralero, V.; Mena, M. L.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 730-736.
- **[Carralero, 2007]:** Carralero, V.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 86-91.
- **[Chen, 2009]_b:** Chen, H. X.; Deng, Q. P.; Zhang, L. W.; Zhang, X. X. *Talanta* 78 (2009) 464-470.
- **[Conneely, 2007]:** Conneely, G.; Aherne, M.; Lu, H.; Guilbault, G. G. *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 153-160.
- **[Cui, 2008]:** Cui, R.; Huang, H.; Yin, Z.; Gao, D.; Zhu, J. J. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1666-1673.
- **[Darder, 2000]:** Darder, M. M. "Tesis Doctoral" Universidad Autónoma de Madrid (2000).
- **[Evtugyn, 2006]:** Evtugyn, G. A.; Eremin, S. A.; Shaljamova, R. P.; Ismagilova, A. R.; Budnikov, H. C. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 56-62.
- **[Houtman, 2009]:** Houtman, C. J.; Sterk, S. S.; van de Heijning, M. P. M.; Brouwer, A.; Stephany, R. W.; van der Burg, B.; Sonneveld, E. *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 247-258.
- **[Inoue, 2007]:** Inoue, K.; Ferrante, P.; Hirano, Y.; Yasukawa, T.; Shiku, H.; Matsue, T. *Talanta* 73 (2007) 886-892.

- [Leinone, 2004]: Leinonen, A.; Kuuranne, T.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. *Steroids* 69 (2004) 101-109.
- [Li, 2002]: Li, X. F.; Ma, M.; Cheng, A.; Zheng, J.; Tam, Y. K. *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 165-171.
- [Liang, 2008]: Liang, K.Z.; Qi, J. S.; Mu, W. J. Chen, Z. G. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2008) 1156-1162.
- [Licea-Pérez, 2008]: Licea-Pérez, H.; Wang, S.; Szapacs, M. E.; Yang, E. *Steroids* 73 (2008) 601-610.
- [Lu, 1996]: Lu, B.; Smith, M. R.; O'Kennedy, R. *Analyst* 121 (1996) 29-32.
- [Lu, 2006]: Lu, H.; Conneely, G.; Crew, M. A.; Aherne, M.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 116-123.
- [Lu, 2007]_b: Lu, H.; Kreuzer, M. P.; Takkinen, K.; Guilbault, G. G. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1756-1763.
- [Manso, 2007]: Manso, J.; Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *J. Electroanal. Chem.* 603 (2007) 1-7.
- [Mitchell, 2009]: Mitchell, J. S.; Lowe, T. E. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2177-2183.
- [Ruth, 2001]: Ruth, A. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15 (2001) 1-16.
- [Saudan, 2004]: Saudan, C.; Baume, N.; Mangin, P.; Saugy, M. *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 157-164.
- [Tijssen, 1985]: Tijssen, P. "Practice and theory of enzyme immunoassays". Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 15 (1985) 414.
- [Xiao, 1999]: Xiao, Y.; Chen, H. X. *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 73-82.

V. CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de la Tesis Doctoral se han investigado distintas estrategias de modificación de electrodos para la preparación de superficies biosensoras utilizando para ello materiales de última generación con propiedades conductoras, electrocatalíticas, solubilizantes y bio-adsortivas diferentes, así como enzimas e inmunorreactivos adecuados para cada especie a determinar.

Los resultados obtenidos han permitido poner de manifiesto la excelente adecuación de las configuraciones desarrolladas a los propósitos analíticos planteados, mejorándose en muchos casos las aportaciones previas descritas en la bibliografía para diseños similares.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **A:** acetaminofeno
- **AA:** ácido ascórbico
- **AAS:** anabolizantes androgénicos
- **Ab:** anticuerpo
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AdsDPV:** voltamperometría de redisolución adsortiva en diferencial de impulsos
- **Ag:** antígeno
- **AgNPs:** nanopartículas de Plata
- **AMA:** Agencia Mundial Antidopaje
- **Anf-pirrol:** derivado de pirrol anfifílico
- **Anti-AFP:** anti-alpha-fetoproteína
- **APTES:** (3-aminopropil)trietoxisilano
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **AuE:** electrodo de oro
- **AuNPs:** nanopartículas de Oro

- **BDD:** electrodo de diamante dopado con boro
- **BSA:** albúmina de suero bovino

- **C₆₀:** fullereno
- **CE:** electrodo de grafito
- **C_H:** región constante de la cadena pesada
- **CH₃CN:** acetonitrilo
- **Chit:** chitosan
- **ChOx:** colesterol oxidasa
- **Cit c:** citocromo c
- **C_L:** región constante de la cadena ligera
- **CNEs:** nanoesferas de carbono;
- **CNTs:** nanotubos de carbono
- **COx:** colina oxidasa
- **CPE:** electrodo de pasta de carbono
- **CPs:** polímeros conductores
- **CR:** reactividad cruzada
- **CV:** voltamperometría cíclica

- **Cyst:** cisteamina

- **DA:** dopamina
- **DBS:** dodecilbencenosulfonato
- **DCF:** dicofol
- **DET:** transferencia directa de electrones
- **DMF:** dimetilformamida
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNR:** daunorubicina
- **DOPAC:** ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos
- **DWCNTs:** nanotubos de carbono de pared doble

- **E₀:** amplitud de excitación sinusoidal
- **EC₅₀:** concentración correspondiente al 50 % de la inhibición respecto a A_{max}
- **EDAC:** clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida
- **EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- **E_{dc}:** potencial de equilibrio
- **E_{ap}:** potencial de detección aplicado
- **EG:** etilenglicol
- **EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica

- **FAD:** flavin adenin dinucleotido
- **F_c:** región constante del anticuerpo
- **FcOH:** ferrocenometanol
- **Fc-SWCNTs:** nanotubos de carbono de pared sencilla funcionalizados con ferroceno
- **Fe@Fe₂O₃NPs:** nanopartículas de hematita/hierro
- **Fe₃O₄NPs:** nanopartículas de magnetita
- **FTIR:** Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier

- **GA:** glutaraldehido
- **GCE:** electrodo de carbono vitrificado
- **GDH:** glutamato deshidrogenasa
- **GOx:** glucosa oxidasa

- **HAuCl₄**: ácido tetracloroáurico
- **HBsAg**: antígeno de la Hepatitis B
- **HCG**: gonadotropina coriónica humana
- **HDL**: lipoproteínas de alta densidad
- **HIAA**: ácido 5-hidroxiindol-3-acético
- **HlgG**: inmunoglobulina G humana
- **HPdNEs**: nanoesferas huevas de paladio
- **HPLC**: cromatografía líquida de alta eficacia
- **HPW**: ácido tungstofosfórico
- **HQ**: hidroquinona
- **HRP**: peroxidasa de rábano
- **HVA**: ácido homovaníllinico

- **IgG**: inmunoglobulina G
- **Igs**: inmunoglobulinas
- **IL**: líquido iónico
- **ISO**: isoproturon
- **ITO**: óxido de indio y estaño

- **K_M**: constante de Michelis-Menten

- **LbL**: metodología Layer-by-Layer
- **L-Cys**: L-cisteína
- **LDH**: lactato deshidrogenasa
- **LDL**: lipoproteínas de baja densidad
- **LOD**: límite de detección
- **LOx**: lactato oxidasa
- **LSV**: voltamperometría de barrido lineal de potencial

- **MBs**: micropartículas magnéticas
- **MEKC**: cromatografía electrocinética capilar micelar
- **MG**: verde de malaquita
- **m-GEC**: magnetocompósito grafito-epoxi

- **MNPs:** nanopartículas magnéticas
- **MPS:** ácido 3-mercapto-1-propano-sulfónico, sal sódica
- **MWCNTs-(SH):** nanotubos de carbono tiolados de pared múltiple
- **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple

- **NaClO₄:** perclorato sódico
- **NAD⁺:** nitotinamida adenina dinucleotido oxidado
- **NADH:** nitotinamida adenina dinucleotido reducido
- **NaNO₂:** nitrito sódico
- **Nf:** nafion
- **NHS:** N-hidroxisuccinimida
- **NiHCF:** ferricianuro de níquel
- **NiNP:** nanopartículas de hexacianoferrato de Níquel
- **NO:** óxido nítrico
- **NOS:** gen terminador de nopalina sintasa

- **P3MT:** poli-(3-metiltiofeno)
- **P3OT:** poli-(octiltiofeno)
- **PAH:** poli-(hidrocloruro de alilamina)
- **PANI:** poli-(anilina)
- **PAT:** gen fosfinotricin acetiltransferasa
- **PB:** azul de Prusia
- **PBS:** regulador fosfato salino
- **PCBs:** bifenilos policlorados
- **PCz:** poli-(carbazol)
- **PDDA:** poli-(dialildimetilamonio)
- **PDMA:** poli-(dimetilanilina)
- **PdNPs:** nanopartículas de Paladio
- **PEDOT:** poli-(3,4-etilendioxitiofeno)
- **PEI:** poli-(etilenimina)
- **PEO:** oxido de poli-(etileno)
- **PGE:** electrodo de grafito pirolítico
- **PoPD:** poli-(orto-fenilendiamina)
- **PPA:** poli-(2,6-piridindiamina)

- **PPy**: poli-(pirrol)
- **Prot A**: proteína A
- **Prot G**: proteína G
- **PSA**: antígeno específico de la próstata
- **PSNS-NH₂**: poli-(4-(2,5-di(tiofeno-2-il)-1H-pirrol-1-il)bencenamina)
- **PSS**: poli-(4-estireno sulfonato)
- **PtDENS**: dendrímeros de Platino
- **PtE**: electrodo de platino
- **PtNPs**: nanopartículas de Platino
- **PTTCA**: ácido poli-(5,2'-5',2''-tertiofeno-3'-carboxílico)
- **PVDF**: fluoruro de polivinilideno

- **QD**: quantum dots

- **RSD**: desviación estándar relativa
- **RuNPs**: nanopartículas de Rutenio

- **SAMs**: monocapas autoensambladas
- **SDS**: dodecilsulfato de sodio
- **SEM**: Microscopía Electrónica de Barrido
- **SiO₂**: dióxido de silicio
- **SPAuEs**: electrodos serigrafados de Oro
- **SPCEs**: electrodos serigrafados de Carbono
- **SPEs**: electrodos serigrafados
- **SPR**: resonancia de plasmón superficial
- **SWCNTs**: nanotubos de carbono de pared sencilla

- **TBAP**: perclorato de tetrabutilamonio
- **TEM**: Microscopía Electrónica de Transmisión
- **Thi**: tionina
- **TiO₂**: dióxido de titanio
- **TMB**: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
- **TTF**: tetratiofulvaleno
- **Tyr**: tirosinasa

- **UA:** ácido úrico

- **V_H:** región variable de la cadena pesada
- **V_L:** región variable de la cadena ligera
- **VOL:** voltaje

- **ZnONPs:** nanopartículas de Óxido de Zinc

