

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales y en materiales magnéticos para la determinación de analitos de interés bioquímico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Serafín González-Carrato

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón

María Gómez Ruiz

Lourdes Agüí Chicharro

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN
NANOMATERIALES Y EN MATERIALES
MAGNÉTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANALITOS DE INTERÉS BIOQUÍMICO**

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón
Catedrático de la UCM

Dra. Paloma Yáñez-Sedeño Orive
Catedrática de la UCM

Dra. Lourdes Agüí Chicharro
Profesora Titular de la UCM

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

VERÓNICA SERAFÍN GONZÁLEZ-CARRATO

MADRID, 2015



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

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

DOÑA M^a CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

HACE CONSTAR,

Que el trabajo titulado *“Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales y en materiales magnéticos para la determinación de analitos de interés bioquímico”* 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, 26 de Enero de 2015

Fdo. M^a Cruz Moreno Bondi

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Paloma Yáñez-Sedeño Orive

Fdo. Lourdes Agüí Chicharro

Fdo. Verónica Serafín González-Carrato

Índice

1. SUMMARY	1
1.1. INTRODUCTION	3
1.1.1. Objectives	4
1.1.2. Electrochemical platforms used for the preparation of biosensors	5
1.1.2.1. Composite electrodes involving carbon nanotubes and gold nanoparticles	5
1.1.2.2. Screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT)	6
1.1.2.3. Screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes, gold and PEDOT nanoparticles	7
1.1.2.4. Glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and poly(pyrrole propionic) acid (pPPA)	7
1.1.3. Biological significance and methods for the determination of the analytes	8
1.1.3.1. Glucosinolates	8
1.1.3.2. Creatinine	9
1.1.3.3. Ethanol	10
1.1.3.4. Human growth hormone	10
1.1.3.5. Prolactin	11
1.1.3.6. Insuline-like growth factor 1	12
1.2. OVERVIEW OF RESEARCH RESULTS	13
1.2.1. Bienenzyme biosensor for the determination of glucosinolates involving entrapment of GOx and MYR into a MWCNTs/AuNPs/Teflon composite electrode	13
1.2.2. Multienzyme biosensor for creatinine using CA, CI and SO immobilized onto MWCNTs/AuNPs/Teflon composite electrode modified with Fc and HRP	16
1.2.3. Electrochemical platform involving electrogeneration of PEDOT in ionic liquid medium onto a SPCE modified with AuNPs and its use to construct ADH and Tyr biosensors	19
1.2.4. Label-free immunosensor for the simultaneous determination of hGH and PRL using SPCEs modified with MWCNTs and gold and PEDOT nanoparticles	22
1.2.5. Electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of hGH using magnetic microparticles functionalized with tosyl groups and screen-printed gold electrodes	26
1.2.6. Amperometric immunosensor for IGF-1 using a glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and poly(pyrrole propionic) acid (pPPA)	28
1.2.7. Voltammetric immunosensor for PRL using a glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and pPPA.	31
1.3. MILESTONES	35

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	41
3. ANTECEDENTES	45
3.1. EMPLEO DE BIOSENSORES EN EL ÁREA DE LA SALUD	47
3.1.1. Biosensores electroquímicos	48
3.1.2. Técnicas de preparación	50
3.1.3. Tipos de electrodos utilizados para la construcción de los biosensores	53
3.1.3.1. <i>Electrodos compósitos de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro</i>	53
3.1.3.2. <i>Electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de oro y poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) electrodepositado en medio líquido iónico</i>	58
3.1.3.3. <i>Electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro y de poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)</i>	63
3.1.3.4. <i>Electrodos de carbono vitrificado modificados con nanotubos de carbono y ácido poli(pirrolpropiónico)</i>	66
3.2.3. Importancia biológica y métodos de determinación de los analitos considerados	69
3.2.3.1. <i>Glucosinolatos</i>	69
3.2.3.2. <i>Creatinina</i>	78
3.2.3.3. <i>Etanol</i>	83
3.2.3.4. <i>Hormona del crecimiento (hGH)</i>	88
3.2.3.5. <i>Prolactina (PRL)</i>	94
3.2.3.6. <i>Factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1)</i>	99
4. PARTE EXPERIMENTAL	103
4.1. INSTRUMENTACIÓN	105
4.1.1. Aparatos	105
4.1.2. Electrodos y células de trabajo	107
4.1.2.1. <i>Electrodos</i>	107
4.1.2.2. <i>Células electroquímicas</i>	109
4.1.3. Otros materiales	110
4.2. REACTIVOS	113
4.2.1. Enzimas	113
4.2.2. Sustratos enzimáticos y cofactores	113
4.2.3. Mediadores redox	113
4.2.4. Anticuerpos	114
4.2.5. Hormonas	114

4.2.6. Productos empleados para la preparación de los electrodos	114
4.2.7. Otros reactivos y materiales	115
4.3. DISOLUCIONES	117
4.3.1. Disoluciones reguladoras de pH	117
4.3.2. Disoluciones de enzimas	117
4.3.3. Disoluciones de sustratos enzimáticos y de mediadores redox	117
4.3.4. Disoluciones de anticuerpos y de hormonas	118
4.3.5. Disoluciones de los monómeros usados para la preparación de los electrodos	118
4.3.6. Otras disoluciones	118
4.4. MUESTRAS	119
4.4.1. Muestras utilizadas para la validación de los biosensores enzimáticos	119
4.4.2. Muestras utilizadas para la validación de los inmunosensores	119
4.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	121
4.5.1. Preparación de los biosensores enzimáticos	121
4.5.1.1. <i>Biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolatos</i>	121
4.5.1.2. <i>Biosensor multienzimático para la determinación de creatinina</i>	122
4.5.1.3. <i>Biosensores de alcohol deshidrogenasa y de tirosinasa basados en electrodos modificados con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)</i>	125
4.5.2. Preparación de los inmunosensores	126
4.5.2.1. <i>Inmunosensor sin marcador para la determinación simultánea de hormona del crecimiento (hGH) y prolactina (PRL)</i>	126
4.5.2.2. <i>Magnetoinmunosensor para la determinación de hormona del crecimiento (hGH)</i>	128
4.5.2.3. <i>Inmunosensor para la determinación de factor de crecimiento insulínico (IGF1)</i>	130
4.5.2.4. <i>Inmunosensor para la determinación de prolactina (PRL)</i>	132
4.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS	135
4.6.1. Determinación del contenido total de glucosinolato en semillas de coles de Bruselas con el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón	135
4.6.2. Determinación de creatinina en suero humano con el biosensor (CA-CI-SO)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón	136
4.6.3. Determinación de etanol en cerveza con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE	136
4.6.4. Determinación simultánea de hGH y PRL en suero y en saliva con el inmunosensor dual anti-hGH-AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE ₁ y anti-PRL-AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE ₂	136

4.6.5. Determinación de hGH en suero humano con el magnetoinmunsensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs	137
4.6.6. Determinación de IGF1 en suero humano con el inmunsensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE	137
4.6.7. Determinación de PRL en muestras de suero y orina con el inmunsensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE	138
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
5.1. BIOSENSORES BASADOS EN MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO	141
5.1.1. Biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolato	143
5.1.1.1. Preparación del biosensor	144
5.1.1.2. Optimización de las variables experimentales	144
5.1.1.3. Calibrados y características analíticas	146
5.1.1.4. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	148
5.1.1.5. Parámetros cinéticos	150
5.1.1.6. Estudios de selectividad	152
5.1.1.7. Determinación de glucosinolatos en semillas de coles de Bruselas	154
5.1.1.8. Conclusiones	157
5.1.2. Biosensor multienzimático para la determinación de creatinina	159
5.1.2.1. Preparación del biosensor	159
5.1.2.2. Calibrado y características analíticas	174
5.1.2.3. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	176
5.1.2.4. Parámetros cinéticos	178
5.1.2.5. Estudio de interferencias	181
5.1.2.6. Aplicación a la determinación de creatinina en suero humano	182
5.1.2.7. Conclusiones	185
5.2 BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E INMUNOSENSORES BASADOS EN MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS	187

5.2.1. Biosensores de alcohol deshidrogenasa y tirosinasa basados en electrodos serigrafados modificados con nanopartículas de oro y poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)	189
5.2.1.1. Preparación del electrodo	190
5.2.1.2. Optimización de las condiciones de electropolimerización	190
5.2.1.3. Caracterización de los electrodos PEDOT/AuNPs/SPCE	193
5.2.1.4. Detección amperométrica de NADH sobre PEDOT/AuNPs/SPCE	197
5.2.1.5. Preparación del biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE	201
5.2.1.6. Determinación de etanol y características analíticas	210
5.2.1.7. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	211
5.2.1.8. Parámetros cinéticos	211
5.2.1.9. Aplicación a la determinación de etanol en cerveza	212
5.2.1.10. Preparación del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE	213
5.2.1.11. Determinación de fenol y características analíticas	220
5.2.1.12. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	221
5.2.1.13. Parámetros cinéticos	223
5.2.1.14. Conclusiones	223
5.2.2. Inmunosensor sin marcador basado en un electrodo serigrafado dual modificado con nanopartículas de oro y de PEDOT para la determinación simultánea de hormona del crecimiento (hGH) y prolactina (PRL)	225
5.2.2.1. Elección de la sonda electroquímica y de la superficie electródica	226
5.2.2.2. Optimización de las variables implicadas en la preparación del electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE	228
5.2.2.3. Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor dual para hGH y PRL	231
5.2.2.4. Calibrados y características analíticas	234
5.2.2.5. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	236
5.2.2.6. Estudio de interferencias	236
5.2.2.7. Aplicación a la determinación simultánea de hGH y PRL en suero humano y saliva	239
5.2.2.8. Conclusiones	241
5.3. INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS	243
5.3.1. Magnetoinmunosensor para la determinación de hGH	246
5.3.1.1. Optimización de las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del inmunosensor	247
5.3.1.2. Calibrado y características analíticas	258
5.3.1.3. Estudios de reproducibilidad y estabilidad	259
5.3.1.4. Estudio de interferencias	260
5.3.1.5. Determinación de hGH en suero humano	261
5.3.1.6. Conclusiones	263

5.4. INMUNOSENSORES BASADOS EN MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS	265
5.4.1. Inmunosensor amperométrico para la determinación de factor de crecimiento insulínico (IGF-1) basado en la inmovilización covalente de anti-IGF1 sobre un electrodo modificado con pPPA/MWCNTs	268
5.4.1.1. <i>Optimización de las variables implicadas en la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE</i>	269
5.4.1.2. <i>Caracterización de los electrodos pPPA/MWCNTs/GCE</i>	273
5.4.1.3. <i>Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor para IGF-1</i>	276
5.4.1.4. <i>Calibrados y características analíticas</i>	285
5.4.1.5. <i>Estudios de reproducibilidad y estabilidad</i>	287
5.4.1.6. <i>Estudio de interferencias</i>	288
5.4.1.7. <i>Determinación de IGF-1 en suero humano</i>	289
5.4.1.8. <i>Conclusiones</i>	291
5.4.2. Inmunosensor voltamperométrico para la determinación de prolactina (PRL) basado en la inmovilización covalente de PRL sobre un electrodo modificado con pPPA/MWCNTs	293
5.4.2.1. <i>Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor para PRL</i>	293
5.4.2.2. <i>Calibrado y características analíticas</i>	302
5.4.2.3. <i>Estudios de reproducibilidad y estabilidad</i>	304
5.4.2.4. <i>Estudio de interferencias</i>	305
5.4.2.5. <i>Aplicación a la determinación de PRL en suero humano y orina</i>	306
5.4.2.6. <i>Conclusiones</i>	308
6. CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES	309
7. BIBLIOGRAFÍA	317
8. PUBLICACIONES	331
9. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	517



Summary

1.1. INTRODUCTION

The determination of biomolecules constitutes an analytical area with paramount interest in the fields of medical, biological and chemical science and technology. Difficulties associated with the transformation of biological information into a measurable signal have been currently overcome thanks to the use of biosensors which are able to provide an excellent connectivity between the biological environment in which the target molecule operates and a transducer.

Among the different types of biosensors, electrochemical ones are prominent due to their remarkable advantages. The electrochemical transduction can be considered as the simplest way to convert the biological event into an electronic signal. Furthermore, the inherent properties of the electrochemical measurement make it possible to achieve high levels of sensitivity, speed of response, accuracy and reproducibility. Moreover, electrochemical devices can be easily miniaturized and are portable.

The general description of the characteristics concerning electrochemical biosensors includes as a key step the surface architecture connecting the biological sample to the transducer. The type of materials involved, its geometry and its size strongly affect the response of the biosensor.

These challenges have been addressed in this work by preparing electrode interfaces using diverse types of materials and establishing different strategies for the immobilization of biomolecules. In some cases, the developed designs constitute the first example of an electrochemical biosensor reported for the target analyte while, in other cases, the developed biosensors exhibit an improved performance with respect to other methodologies available and showing a remarkable usefulness for the analysis of real samples.

1.1.1. Objectives

The research implied in this work was focused to construct sensitive and selective electrochemical platforms for the determination of some species of biological and clinical interest: glucosinolates, creatinine and various hormones (prolactin, human growth hormone and insulin-like growth factor 1). Different alternatives for electrode modification with gold nanoparticles, carbon nanotubes, conducting polymers and/or functionalized magnetic microparticles have been employed as well as various strategies for biomolecules immobilization including entrapment, adsorption on composite materials, and covalent binding.

The specific objectives were:

1. Preparation of a bienzyme biosensor for the determination of glucosinolates involving entrapment of glucose oxidase and myrosinase enzymes into carbon nanotubes/gold nanoparticles/ Teflon composite electrodes.
2. Design of a multienzyme biosensor for creatinine using creatininase, creatinase and sarcosine oxidase immobilized onto carbon nanotubes/gold nanoparticles/Teflon composite electrodes modified with ferrocene and peroxidase.
3. Preparation of an electrochemical platform involving electrogeneration of poly(3,4-ethylenedioxy-thiophene) (PEDOT) in ionic liquid medium onto a screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles, and its use to construct alcohol dehydrogenase and tyrosinase biosensors.
4. Preparation of a label-free immunosensor for the simultaneous determination of human growth hormone (hGH) and prolactin (PRL) using screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes, and gold and PEDOT nanoparticles.
5. Preparation of an electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of hGH using magnetic microparticles functionalized with tosyl groups and screen-printed gold electrodes.
6. Development of an amperometric immunosensor for the determination of insulin-like growth factor 1 (IGF1) using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and poly(pyrrole propionic) acid.

7. Preparation of a voltammetric immunosensor for the determination of prolactin (PRL) using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and poly(pyrrole propionic) acid.

1.1.2. Electrochemical platforms used for the preparation of biosensors

The electrode materials and fabrication strategies followed for the preparation of the biosensors developed in this work are discussed below.

1.1.2.1. Composite electrodes involving carbon nanotubes and gold nanoparticles

Enzyme biosensors constructed using carbon nanotubes (MWCNTs) composite electrodes have demonstrated to possess improved analytical performance with respect to composite matrices prepared with graphite as a consequence of coupling the unique properties of MWCNTs with the well-known advantages of composite electrode designs such as simple renewability and low background currents. Moreover, due to the low solubility of MWCNTs in most common solvents, the fabrication of composites is an adequate manner to confine MWCNTs in electrochemical transducers. In this context, composites prepared with gold nanoparticles (AuNPs)/MWCNTs mixtures exhibit particularly relevant properties due to the synergic combination of the nanoparticles ability to adsorb proteins with no loss of bioactivity, with the electrocatalytic properties of MWCNTs towards the oxidation of molecules of biochemical interest such as H_2O_2 or NADH.

In this work, composite electrodes prepared with AuNPs, MWCNTs and Teflon as the non-conducting binding material were used. The main characteristic of this type of electrodes is that the resulting mixture of components constitutes the entire conductive platform. A general advantage of this method is the possibility of incorporation of biomolecules into the composite matrix during its fabrication step, thus keeping the biomolecules trapped in a three-dimensional deposit maintaining good stability and long periods of useful life. This kind of electrodes was used in this work for the construction of two enzymatic biosensors for the determining of glucosinolates and creatinine, respectively.

1.1.2.2. *Screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) is a conducting polymer with a high electrochemical stability and low energy bandgap suitable for a wide range of applications including the preparation of electrochemical sensors. Despite the PEDOT stability in both doped and un-doped states, the use of PEDOT-coatings as enzyme immobilization matrices for the preparation of biosensors is scarce, conversely to that occurs with other conducting polymers such as polypyrrole. This is probably due to the fact that water is not adequate for EDOT polymerization because of the poor solubility of the monomer and the interaction of water molecules with the polymerization intermediate. The use of ionic liquids (ILs) as solvents for enzymes and the growth medium for electro-synthesis of PEDOT is an interesting approach to overcome these problems. The characteristics of ILs, acting simultaneously as the solvent and supporting electrolyte, affect the rate of the electropolymerization process as well as the morphology and conductivity of the resulting polymer.

Gold nanoparticles-modified SPCEs were used in this work as electrode platforms to develop a novel configuration for the construction of both dehydrogenase and oxidase enzyme electrochemical biosensors. As representative examples of these enzymes groups, aldehyde dehydrogenase or tyrosinase were entrapped during the electropolymerization of EDOT using 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIMPF₆) as the solvent.

1.1.2.3. Screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes, gold and PEDOT nanoparticles

The combination of conducting polymers (CP) and carbon nanotubes have received particular interest because the resulting hybrid material (CP/MWCNTs) shows the properties of both components enhanced by the synergistic effect of the mixture. Its use in the modification of electrodes often results in intense electrocatalytic effects and electrochemical responses of larger magnitude than those obtained at electrodes modified with the individual materials. On the other hand, the use of polymer nanostructures instead of conventional electrodeposited films provides higher conductivity and faster switching processes, due to the higher surface area of nanomaterials. It can be also highlighted the low cost, ease of preparation and ability to scaled production with different particle sizes and/or inclusion of specific functions of nano-sized CPs.

In this work, a label-free immunosensor for the simultaneous determination of hGH and PRL was prepared by using as transducer an electrochemical platform composed of MWCNTs/SPCEs modified with PEDOT nanoparticles and AuNPs. The corresponding growth hormone and prolactin antibodies were immobilized on the AuNPs and dopamine was used as the electrochemical probe.

1.1.2.4. Glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and poly(pyrrole propionic acid (pPPA)

Despite the advantages of the carbon nanotubes/conducting polymer hybrids (CP/MWCNTs), these materials are still scarcely used for the preparation of electrochemical immunosensors. This is because the strict conditions in which the immunoreagents must be incorporated into the transducer surface make it necessary to design platforms suitable for the ordered immobilization of antibodies without hindering the antigen-antibody binding or losing the conductive properties of the polymer. An effective alternative to avoid these difficulties is the use of CPs bearing carboxyl or amine functional groups for the covalent attachment of biomolecules. One of these functionalized polymers is poly(pyrrole propionic acid (pPPA). Electrode surfaces modified with electropolymerized pPPA provide a high content of carboxyl groups suitable for covalent binding.

In this work, pPPA/MWCNTs-modified glassy carbon electrodes were used for the development of an amperometric immunosensor for the determination of the hormone insulin-

like growth factor 1 (IGF1) involving a sandwich immunoassay, and a voltammetric immunosensor for the determination of prolactin (PRL) based on an indirect competitive immunoassay.

1.1.3. Biological significance and methods for the determination of the analytes

1.1.3.1. *Glucosinolates*

Glucosinolates (β -thioglucoside-N-hydroxysulfates) are natural compounds mainly found in genus Brassica of Cruciferae family including vegetables as broccoli, Brussels sprouts, cabbage and cauliflower, among others [Fahey, 2001]. When plant cell tissues containing glucosinolates are damaged, i.e. by cutting, the enzyme myrosinase initiates a rapid hydrolysis yielding glucose, sulfate, isothiocyanates, thiocyanates, nitriles or oxazolidine-2-thiones. Glucosinolates and their degradation products have attracted much attention recently due to their positive anticarcinogenic properties as well as their antinutritional and toxic effects.

The determination of total glucosinolates has been accomplished mainly by liquid chromatography-mass spectrometry [Rochford, 2008]. Previous research on electrochemical biosensors for glucosinolate determination include co-immobilization of the enzymes myrosinase and glucose oxidase on a platinized carbon electrode [Koshy, 1988], the development of an amperometric flow analyzer, in which myrosinase was immobilized on aminopropyl-modified controlled pore glass to construct a packed bed reactor [Tsiafoulis, 2003], and a biosensor where myrosinase and glucose oxidase were immobilized onto an eggshell membrane using a dissolved oxygen electrode as the transducer [Wu, 2005].

1.1.3.2. Creatinine

Creatinine (2-amino-1-methyl-2-imidazoline-4-one) is the final product of creatine metabolism in mammals and constitutes an important clinical marker in the diagnosis of renal and muscular dysfunctions [Lad, 2008], acute myocardial infarction, and in the control of patients receiving hemodialysis. The normal creatinine levels in serum are between 44 and 106 μM , but they can increase up to 1000 μM during nephrons malfunction or, conversely, fall below 40 μM due to a decreasing of muscle mass.

The determination of creatinine is usually performed by a spectrophotometric method based on the Jaffe's reaction yielding a red-orange colored complex despite the poor selectivity of this method [Jaffe, 1880]. Moreover, enzyme photometric methods using creatinine deaminase and glutamate dehydrogenase with monitoring of NADH at 340 nm have been also widely used [Weber, 1991]. More recently, chromatographic techniques [Georges, 2006] and capillary electrophoresis [Tuma, 2005] were also employed for the determination of creatinine in serum and urine.

As in other fields of clinical analysis, the use of sensors and biosensors for the determination of creatinine has been proposed as an efficient way to reduce costs, time of assay and complexity of routine monitoring of biological fluids. Creatinine biosensors have been reviewed [Killiard, 2000], those using electrochemical transducers being predominant. Among them, most of the reported amperometric and voltammetric biosensors involved the enzymes creatininase (creatinine amidohydrolase, CA), creatinase (creatinine amidohydrolase, CI), and sarcosine oxidase (SO), and the subsequent detection of the generated hydrogen peroxide using different electrode materials [Hsiue, 2004; Yadav, 2011].

1.1.3.3. *Ethanol*

The determination of ethanol has great importance in clinical analysis and technological areas, mainly in the food production. The number of electrochemical biosensors developed in recent years to carry out this determination has been enormous, and this topic has been reviewed in different publications [Azevedo, 2005; Yáñez-Sedeño, 2014]. In these configurations alcohol dehydrogenase (ADH) in the presence of cofactor NAD⁺, or alcohol oxidase (AOX) are used. The latter alternative is simpler, as only oxygen is required for the oxidation of ethanol. However, a major problem with this scheme is the low stability of the enzyme.

Most of recent designs based on ADH use nanomaterials. For example, glassy carbon electrodes modified with MWCNTs have been used in various applications [Manso, 2008; Yang, 2009; Lee, 2009; Salimi, 2010; Teymourian, 2012]. These configurations take advantage of the high electrical conductivity of carbon nanotubes as well as the electroanalytical activity towards the oxidation of NADH. Some biosensors also incorporate other materials often used as redox mediators, as is the case of Blue Meldola [Santos, 2006], Blue Nile [Du, 2007], or Brilliant Cresyl Blue [Yang, 2009], polymerized or not on the electrode surface, that help to accentuate the displacement effect of the potential at lower values.

1.1.3.4. *Human growth hormone*

Human growth hormone (hGH) is a polypeptide hormone synthesized and secreted by the anterior pituitary gland [Popii, 2004]. Circulating hGH consists of various isoforms, the 22-kDa hGH being largely the most prevalent form. This hormone is essential for body growth since it stimulates the production of insulin growth factor (IGF-1), which in turn stimulates the production of cartilage cells, resulting in bone growth. Also, it plays important roles in the metabolism of proteins, lipids and carbohydrates. The determination of hGH is necessary to diagnose various disorders occurring in childhood and the existence of pituitary tumours. hGH is released into the circulation in a pulse manner, with peaks between 50 and 100 ng/mL and minimum levels of 0.03 ng/mL. Considering that both the deficiency or excess of hGH have great effect on normal physiology, sensitive and selective methods for the determination of this hormone in a wide range of concentrations in biological samples are needed. Furthermore, the

detection of hGH is also important in sport medicine because this hormone is forbidden by the World Anti-Doping Agency as it is used to increase performance in some disciplines.

Various immunochemical methods can be found in the literature for the determination of hGH. Regarding immunosensing techniques, surface plasmon resonance (SPR) methodologies were described for the determination of hGH in serum samples, achieving a detection limit of 4 ng/mL [Treviño, 2009], as well as for the determination of various pituitary hormones in serum and urine, with a working range for hGH that extended from 33 to 1337 ng/mL [Treviño, 2009a]. On the other hand, an impedimetric immunosensor which involved the immobilization of a specific monoclonal antibody onto gold nanoparticle-coated 1,6-hexanedithiol-modified gold electrode was also reported, with a claimed detection limit of 0.64 pg/mL [Rezaei, 2009].

1.1.3.5. Prolactin

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone with a single chain of 199 residues and a molecular mass of 23 kDa, which is considered as one of the most versatile hormones in terms of biological actions [Sinha, 1995]. It is secreted by the anterior pituitary and stimulates milk production in the mammary glands as well as the synthesis of progesterone in the corpus luteum. The determination of prolactin in women serum is needed in the case of menstrual disturbances, galactorrhea or infertility. High levels of PRL in serum (>20 ng/mL) may indicate the presence of a prolactinoma [Souter, 2010]. Furthermore, urinary PRL appears to be a suitable biomarker for the detection of preeclampsia [Leaños-Miranda, 2008]. Various ELISA kits are commercially available for the determination of PRL with dynamic ranges mostly covering from tenths or units to various hundreds ng/mL PRL. Regarding immunosensors, very few designs have been described in the literature. A multianalyte device determined PRL together with other hormones in human serum by means of a mixture of analyte-specific biotinylated antibodies and fluorometric detection [Petrou, 2002]. A voltammetric magnetoimmunosensor for PRL involving the use of disposable screen-printed electrodes and biotinylated anti-PRL conjugates attached on streptavidin-functionalized magnetic beads was also reported. A sandwich-type immunoassay with alkaline phosphatase (AP)-labelled anti-PRL was used, and PRL was determined by differential pulse voltammetry of 1-naphthol formed in the enzyme reaction with 1-naphthyl phosphate as AP substrate. A linear range between 10 and 2000 ng/mL and a limit of detection of

3.74 ng/mL were obtained [Moreno-Guzmán, 2011]. More recently, poly(o-phenylenediamine)-carried nanogold (GPPD) particles functionalized with HRP-anti-PRL conjugates were used for the development of an electrochemical PRL immunosensor by immobilization of anti-PRL onto a glassy carbon electrode and use of GPPD-labeled HRP-anti-PRL as molecular tags. A dynamic range from 0.5 to 180 ng/mL PRL and a detection limit of 0.1 ng/mL were achieved [Chen, 2012].

1.1.3.6. *Insuline-like growth factor 1*

Insulin-like growth factor 1 (IGF1) is a peptide hormone containing 70 amino acid residues [Miura, 1992]. Pituitary secretion of growth hormone (GH) stimulates IGF1 production in the liver which then acts upon peripheral tissues. IGF1 has significant mitogenic effects and is involved in mechanisms of function, maintenance and repair of many tissues [Frystyk, 2004]. IGF1 plays important roles in a number of human malignancies contributing to unregulated cell proliferation and, moreover, this hormone exerts an acute anabolic action on protein and carbohydrate metabolism by increasing the cellular uptake of amino acid and glucose.

The determination of IGF1 is usually performed by ELISA methods using optical detection. However, these methods suffer, in general, from relatively high detection limits, short calibration ranges, in particular for the lower analyte concentrations and, low precision levels, when compared with the analytical performance that can be achieved using immunosensors. To our knowledge, only one immunosensor for IGF1 has been described in the literature. It is an impedimetric immunosensor where anti-IGF1 antibody was immobilized onto gold electrodes modified with 1,6-hexanedithiol self assembled monolayers bearing gold nanoparticles. The range of linearity reported ranged between 1.0 and 180.0 pg/mL and the achieved limit of detection was 0.15 pg/mL [Rezaei, 2011].

1.2. OVERVIEW OF ACHIEVED RESULTS

1.2.1. Bienzyme biosensor for the determination of glucosinolates involving entrapment of GOx and MYR into MWCNTs/AuNPs/Teflon composite electrodes

A novel electrochemical biosensor design for the determination of glucosinolates was prepared involving bulk-incorporation of the enzymes glucose oxidase and myrosinase into a gold nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes composite electrode using teflon as the binder. Myrosinase catalyzes the hydrolysis of glucosinolates forming glucose, which is enzymatically oxidized. The generated hydrogen peroxide was electrochemically detected at the nanostructured composite electrode at $E = + 0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. The synergic effects provided by gold nanoparticles and MWCNTs allowed the preparation of a mediator less glucose biosensor exhibiting remarkable higher sensitivity for glucose and stability than those achieved with other GOx-MWCNTs biosensors reported in the literature.

Once optimized the experimental variables, a calibration plot for sinigrin, used as the glucosinolate target, in the linear range from 0.02 to 1.0 mM, and with a slope value of $1.89 \pm 0.04 \text{ mA/M}$, was obtained. The detection and quantification limits, 5.9 μM and 20 μM , respectively, were calculated according to the $3s_b/m$ and $10s$ criteria, respectively, where m is the slope value of the linear part of the calibration graph, s_b was estimated as the standard deviation ($n=10$) of the amperometric responses of different sinigrin solutions at the lowest concentration level of the calibration graph, and s was the same standard deviation expressed in terms of concentration. It was demonstrated that bienzyme MYR/GOx/AuNPs/MWCNT/Teflon exhibited improved analytical characteristics for the glucosinolate sinigrin with respect to a biosensor constructed without gold nanoparticles, i.e. a MYR/GOx/MWCNT/Teflon electrode, as well as with respect to other enzyme methods for glucosinolate reported in the literature. For example, in spite of using a detection potential 150 mV less positive, the detection limit obtained with the proposed design was one order of magnitude lower than those reported with an amperometric flow injection system using a packed-bed MYR reactor and GOx immobilized on a platinum electrode [Tsiafoulis, 2003]. This improvement in the analytical performance is attributable to the

properties of gold nanoparticles, in particular their capability to immobilize proteins retaining their biological activity, and the enhanced electrode kinetics for the oxidation of hydrogen peroxide.

An inherent advantage of composite biosensors with Teflon as the binder is their high stability. Different aspects concerning the glucosinolate biosensor stability were evaluated. Five successive calibration plots for sinigrin in the $(0.2-1.0) \times 10^{-3}$ M concentration range were constructed using the same MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor. A relative standard deviation, RSD=3.2% for the slope values was obtained, thus indicating a good repeatability of the amperometric measurements. Furthermore, the inter-assay reproducibility was also evaluated. Five different MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensors were used to measure in different days five different 2.0×10^{-4} M sinigrin solutions. A RSD value of 6.5% was found, which means a good reproducibility in the fabrication procedure of the nanostructured composite bioelectrodes.

The lifetime of a single MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor was tested by performing everyday three measurements for 6.0×10^{-4} M sinigrin. When not in use, the biosensor was stored under dry conditions at -18 °C. A control chart was constructed in which the mean current values remained inside the control limits set at ± 3 x standard deviation of the measurements carried out the first day of the assay, for nine days with no need for applying any regeneration procedure to the bioelectrode surface. As a comparison, a similar set of experiments performed with a biosensor prepared without of gold nanoparticles showed a lifetime of only four days. This difference can be attributed to the well known ability of these nanoparticles to adsorb proteins retaining their biological activity. Finally, the biosensor storage performance was also evaluated. When the composite electrode matrix was dry stored at -18 °C for two months, the biosensors prepared from this composite matrix yielded amperometric measurements for sinigrin which did not differ significantly from those measured with a biosensor constructed with the fresh electrode matrix.

A good fit to the Michaelis-Menten kinetics was observed with a value for the “x” parameter from the Hill’s plot of 1.02. An apparent constant $K_M^{app} = 7.9 \pm 0.6$ mM ($n=3$) was calculated. Furthermore, a high selectivity with respect to various potential interfering substances that could be present in real samples together with glucosinolates, was observed. Some ionic salts (NaCl, $CaCl_2$), organic acids (acetic, malic, tartaric, succinic and oxalic acids), amino acids

(glutamic acid, glycine, cysteine) and degradation products (allyl isothiocyanate, phenethyl isothiocyanate) were tested. It was observed that none of these compounds, at a concentration level of 2.0×10^{-4} M, produced a significant amperometric response except in the case of cysteine. This compound exhibited a high amperometric signal which is attributed to the oxidation of the thiol group at the gold nanoparticle-modified electrode. However, the determination of glucosinolates in vegetables is not affected by this interference because the sample pretreatment carried out (see below) cannot extract free amino acids.

The usefulness of the MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor for the analysis of real samples was checked by determining glucosinolates in Brussel sprout seeds. In this work, a sample preparation procedure which was previously described for the analysis of broccoli seeds by liquid chromatography, was adapted. This procedure involved purification of the seed extracts using C_{18} and NH_2 SPE cartridges in series. When the aqueous extract is passed through the C_{18} cartridge, organic material is entrapped, while the charged glucosinolate passed and kept retained on the protonated amino propyl cartridge. The determination of sinigrin was performed by applying the standard additions method, which involved successive additions of sinigrin standard to the sample solution. The results obtained for five seeds samples gave a mean value of 0.68 ± 0.05 mM for a significance level of 0.05. In order to evaluate the accuracy of the method, recovery studies were also carried out by adding known amounts of sinigrin to the samples. The results obtained were in the 91.8 - 100 % range, thus confirming the usefulness of the biosensor for the determination of glucosinolates in this kind of samples.

1.2.2. Multienzyme biosensor for creatinine using CA, CI and SO immobilized onto MWCNTs/AuNPs/Teflon composite electrodes modified with Fc and HRP

A composite electrode consisting of gold nanoparticles, multi-walled carbon nanotubes and Teflon, into which peroxidase (HRP) and ferrocene (Fc) were incorporated as auxiliary enzyme and redox mediator, respectively, was constructed. The enzymes creatininase (CA), creatinase (CI) and sarcosine oxidase (SO) were then co-immobilized onto the surface of the resulting HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon electrode for the preparation of a creatinine biosensor. CA hydrolyzes creatinine selectively producing creatine, which is subsequently hydrolyzed in the presence of CI to give urea and sarcosine. Sarcosine is further oxidized by sarcosine oxidase generating formaldehyde and glycine together with hydrogen peroxide which is catalytically reduced in the presence of HRP. The regeneration of the reduced form of HRP is mediated by Fc forming the oxidized form of the mediator, ferricinium (Fc^+), which is electrochemically reduced at the electrode surface. Accordingly to this sequence, the magnitude of the amperometric response is proportional to the creatinine concentration present in the sample.

All variables involved in the preparation of the electrode and the biosensor functioning were optimized. These were the type and loading of redox mediator, the detection potential value, the HRP loading, the value of pH, the strategy for immobilization of CA, CI and SO, and the enzymes loading. At the experimental conditions selected for creatinine determination, a linear calibration plot was obtained by amperometry at 0.0 V vs Ag/AgCl, in the 0.003–1.0 mM concentration range, with a slope value of $1.59 \pm 0.01 \mu\text{A}/\text{mM}$. It is important to remark that such range is appropriate for the clinical application of the multienzyme biosensor. The limit of detection, 0.1 μM , was calculated according to the $S/N = 3$ criterion from repetitive measurement of 10 amperograms corresponding to the lowest creatinine concentration in the calibration plot (0.003 mM). The obtained value was the lowest of all reported biosensors for creatinine together with that reported using the covalent immobilization of the enzymes onto a MWCNT/polyaniline/Pt electrode [Yadav, 2011].

The reproducibility of the responses attained with five different (SO/CI/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensors was also tested. Mean values of three repetitive measurements for creatinine made with the five biosensors yielded a RSD value of 4.2% thus revealing a good reproducibility in the construction of the multienzyme biosensor. Moreover, the lifetime of a single biosensor was checked by performing everyday three measurements for 0.05 mM creatinine. After each set of measurements the biosensor was stored in a closed cell over a 0.1 M PBS pH 7.4 solution. The average steady state current remained inside the control limits, set at ± 3 x the standard deviation of the responses obtained the first working day, for around fifteen days since the biosensor preparation with no regeneration of the electrode surface.

The biosensor response fitted well to a Michaelis-Menten-type kinetic as it was demonstrated by calculating the “x” parameter of the corresponding Hill’s equation, 1.060 ± 0.007 . Since the developed electrochemical biosensor involved the sequential functioning of four enzymes, the slowest reaction acting as the limiting step of the response was identified by calculating the corresponding rate constants (k_{ap}) from the $\ln i$ vs time plots obtained by successive additions of 0.05 mM aliquots of the respective substrates. The k_{ap} values calculated from the slope of the linear range for each graph were: CA, $0.103 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0.995$); CI, $0.129 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0.991$); SO, $0.357 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0.996$); HRP, $0.46 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0.993$). Therefore, one can conclude that the slowest enzyme reaction in the multienzyme biosensor was the hydrolysis of creatinine catalyzed by creatininase. Consequently, the value of the apparent Michaelis-Menten constant was calculated for this reaction being $K_M^{app} = 4.1 \pm 0.4$ mM. This result indicated that an acceptable enzyme-substrate affinity existed under the immobilization conditions used for the preparation of the biocomposite electrode.

The effect of various potentially interfering species on the determination of creatinine with the (SO/CI/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor was evaluated. Compounds such as methionine, 4-amino phenyl acetic acid, glycine, ascorbic acid and uric acid were tested at a 0.1 mM concentration level. The results obtained revealed that none of these compounds exhibited any current signal at the potential applied to the electrode thus demonstrating the excellent selectivity of the proposed approach.

The developed biosensor was validated with good results by determining creatinine in human serum and correlating with the spectrophotometric Jaffe's method. Two different types of human serum: a certified reference material, BCR® containing $68.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$ creatinine, and human serum spiked with 10, 50 and 90 μM creatinine were analyzed. In the case of the reference serum, the slope value of the calibration plot for creatinine measured by applying the standard additions method was $1.32 \pm 0.04 \mu\text{A}/\text{mM}$ therefore revealing the existence of a matrix effect from the serum constituents. Three replicates for the analysis of the certified sample with the (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor by applying the standard additions method gave an average creatinine concentration of $68 \pm 3 \mu\text{M}$, with a mean recovery of $98 \pm 4\%$, thus demonstrating the accuracy of the developed procedure.

Concerning the spiked serum, the slope value of the linear range ($r=0.9997$) in the calibration plot constructed in the reconstituted sample was $1.64 \pm 0.01 \mu\text{A}/\text{mM}$. This value was statistically compared with that calculated for the calibration plot constructed with creatinine standards ($1.59 \pm 0.01 \mu\text{A}/\text{mM}$). The application of the Student t test revealed that there was no a significant matrix effect with this type of spiked serum samples. The analysis of serum spiked with 10, 50 or 90 μM creatinine provided mean concentration values ($n = 5$) of $10.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $48 \pm 2 \mu\text{M}$ and $91 \pm 6 \mu\text{M}$, respectively, with mean recoveries ranging between 96 and 103%, which also demonstrated the reliability of the method. In order to compare the performance of the (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon biosensor with the well established spectrophotometric method based on the use of picric acid, a correlation test was carried out. A linear plot ($r = 0.9994$) exhibiting a slope value of 1.00 ± 0.01 and an intercept of -0.005 ± 0.008 was obtained. Both the slope and intercept values included the unity and zero values, respectively, thus demonstrating an excellent correlation between both methods.

1.2.3. Electrochemical platform involving electrogeneration of PEDOT in ionic liquid medium onto a SPCE modified with AuNPs, and its use to construct ADH and Tyr biosensors

A novel electrochemical platform for the preparation of disposable enzyme biosensors was fabricated by electrodeposition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) using the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIMPF₆) as the electropolymerization solvent onto gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (SPCE). Further, these electrodes were used for the preparation of alcohol dehydrogenase (ADH) and tyrosinase (Tyr) biosensors by entrapment of the respective enzyme on the electrode surface during the electropolymerization step. The ionic liquid BMIMPF₆, where the enzymes ADH and Tyr exhibited a good enzymatic activity and stability, was selected as an appropriate medium for PEDOT electrogeneration from EDOT solutions.

The polymerization process was optimized by evaluating the effect of the potential value and electrodeposition time on the amperometric response for NADH as the target compound. Under the selected polymerization conditions, $E_{\text{dep}} = +800$ mV and $t = 5$ min, a calibration plot in the 1.0 - 100 μM NADH concentration range was obtained using a detection potential of +300 mV. The slope value of this calibration plot at the PEDOT/AuNPs/SPCE was 168 ± 4 mA/M more than one order of magnitude higher than that obtained at a PEDOT/SPCE. This result agreed with those obtained by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy at both types of modified SPCEs revealing an enhanced active surface area due to the presence of gold nanoparticles.

All variables involved in the fabrication and performance of ADH/PEDOT/AuNPs/SPCEs biosensor were optimized. These were the gold nanoparticles loading onto SPCE, the potential and time used for the polymer deposition, the enzyme loading, the pH value for the enzyme reaction and the concentration of NAD⁺ cofactor. In this case, electropolymerization was carried out at a potential value of +600 mV, less positive than that previously optimized because of the possible degradation of the enzyme when applying very positive potentials.

Using a detection potential of +300 mV, a calibration graph for ethanol with a linear range between 5 and 100 μM ($r=0.9992$) was obtained. The limit of detection calculated by the $3s_b/m$ criterion was 2 μM . The comparison of the analytical characteristics of the ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE biosensor with those reported for other recent designs of ADH electrochemical biosensors using non-covalent enzyme immobilization allowed concluding that the developed bioelectrode permitted a relative low operating potential to be applied in the absence of mediator, and provided a wide range of linearity and a low detection limit that is among the lowest reported values.

Once demonstrated that the enzyme reaction at the biosensor fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, a value of $K_M^{\text{app}} = 0.15 \text{ mM}$ was calculated from the Lineweaver–Burk plot. This value is lower than those reported using other configurations, indicating a high affinity of the enzyme for the substrate under the microenvironment provided by PEDOT electrodeposited onto AuNPs/SPCE.

Different aspects regarding the stability of the ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE biosensor were also evaluated. Firstly, the reproducibility of the responses obtained with different biosensors was tested. Ten bioelectrodes were constructed and used to measure the amperometric signals from 10^{-4} M ethanol solutions in different days. The RSD value obtained, 4.9%, revealed the good reproducibility achieved in the construction of the ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE bioelectrodes. The easiness of biosensor fabrication procedure, together with the special characteristics of SPCEs, makes it possible their use as disposable bioelectrodes. Nevertheless, the lifetime of a single biosensor was also checked by measuring repeatedly the amperometric responses from different 50 μM ethanol solutions. After 30 measurements, the current remained 83% of the initial current response.

As an application of the ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE biosensor for the analysis of real samples, the determination of ethanol was accomplished in a commercial alcohol-free beer (Buckler <1 vol.%) and in a certified beer (BCR-651, 0.505% ethanol). It was demonstrated that just an appropriate sample dilution with the supporting electrolyte was needed before performing the amperometric measurements. The determination of ethanol was accomplished by applying the standard additions method in order to minimize the slight matrix effect observed. Mean ethanol concentrations for the analysis of five aliquots of each sample were $0.96 \pm 0.08\%$ for

commercial free-alcohol beer (<1% ethanol), and $0.50 \pm 0.06\%$ for the certified beer (0.505%). As it can be readily seen, these results demonstrate fairly well the usefulness of the biosensor for the analysis of this kind of real samples.

The PEDOT/AuNPs/SPCEs electrodes were also tested for the preparation of tyrosinase biosensors. Similarly to ADH biosensors, Tyr was entrapped during the PEDOT electropolymerization step. The construction of the biosensor was optimized using phenol as the target compound, and the variables affecting the construction and performance of the biosensor were optimized. The potential value employed for the potentiostatic electrogeneration of the polymer from the monomer solution containing the enzyme was +200 mV.

Amperometric detection at -150 mV allowed a linear calibration graph for phenol to be obtained over the 0.1 - 50 μM ($r=0.997$) concentration range with a limit of detection ($3s_b/m$) of 0.02 μM . Similarly to that occurred with the ADH biosensor, when the analytical performance of the Tyr biosensor was compared with that reported for other recent Tyr biosensor designs involving non-covalent enzyme immobilization, it could be deduced that the developed Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE allowed a wide range of linearity to be obtained and provided a limit of detection comparable to the best ones reported previously. Also, the enzyme reaction at the Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE biosensor fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, the apparent K_M^{app} value being 0.025 M, which was also among the lowest reported values using other configurations. This indicated again a high affinity of the enzyme for the substrate in the microenvironment provided by PEDOT/AuNPs/SPCE.

1.2.4. Label-free immunosensor for the simultaneous determination of hGH and PRL using SPCEs modified with MWCNTs and gold and PEDOT nanoparticles

A label-free dual electrochemical immunosensor was constructed for the simultaneous determination of human growth (hGH) and prolactin (PRL) hormones. The immunosensor used an electrochemical platform composed of carbon nanotubes-screen printed carbon electrodes (MWCNTs/SPCEs) modified with gold and poly(ethylene-dioxythiophene) (PEDOT) nanoparticles, on which the corresponding hGH and PRL antibodies were immobilized. The affinity reactions were monitored by measuring the decrease in the differential pulse voltammetric oxidation response of the redox probe dopamine. The experimental variables involved in the preparation of both AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE modified electrodes and the dual immunosensor were optimized. The immunosensor exhibited an improved analytical performance for hGH and PRL with respect to other electrochemical immunosensor designs, showing wide ranges of linearity and low detection limits of 4.4 and 0.22 pg/mL, respectively. An excellent selectivity against other hormones and in the presence of ascorbic and uric acids was found. The usefulness of the dual immunosensor for the simultaneous analysis of hGH and PRL was demonstrated by analyzing human serum and saliva samples spiked with the hormones at different concentration levels.

MWCNTs-modified SPCE were selected as electrode platform to support further modifications due to the well known behavior of these electrodes in terms of achievable high current response and excellent reproducibility of the measurements. The label-free immunoplatfrom design involved modification of MWCNTs/SPCEs with PEDOT and gold nanoparticles and the use of dopamine as an adequate voltammetric probe. This modification was justified by the improved voltammetric response of dopamine at the AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE as well as the stable immobilization of the biomolecules. Cyclic voltammograms recorded for dopamine demonstrated that in the presence of PEDOT nanoparticles an improved electron transfer was observed probably as a consequence of the ability of this polymer to act as an electronic mediator as a consequence of its rich electronic cloud, as well as the hydrophobic environment provided by the polymer which favored a more reversible oxidation of dopamine. The subsequent modification of PEDOT/MWCNTs/SPCEs with gold nanoparticles provoked a slight shift of dopamine anodic and cathodic peaks towards less

positive potential values and an increase in the oxidation peak current. This behavior can be explained taking into account that, at the working pH value, 7.4, cationic dopamine can be adsorbed on negative charged gold nanoparticles prepared from citrate-colloidal gold. The apparent narrower oxidation peak shape observed with the AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE supports this assumption.

The experimental variables involved in the preparation of the modified electrode were optimized using single MWCNTs/SPCEs. These were the loading of PEDOT nanoparticles deposited, and the time for incubation of the PEDOT/MWCNTs/SPCE into the gold nanoparticles suspension. Furthermore, optimization studies were also carried out for the preparation of hGH and PRL dual immunosensor. Such studies comprised the anti-hGH and anti-PRL antibodies loadings and the influence of BSA concentration and time for incubation to block unspecific adsorptions.

Calibration plots for hGH and PRL were constructed with the dual immunosensor under the optimized conditions. Linear ranges between 0.05 - 1000 ng/mL hGH ($r=0.991$) and 0.001–1000 ng/mL PRL ($r=0.992$) were much wider than those reported for other electrochemical immunosensors. The respective limits of detection were calculated according to the $3s_b/m$ criterion, where s_b was estimated as the standard deviation ($n = 10$) of the zero value (the i_p value measured in the absence of hGH or PRL). The LOD value for hGH, 4.4 pg/mL, is much better than the reported with a SPR immunoassay (4 ng/mL) [Treviño, 2009]. Regarding PRL, the achieved LOD, 0.22 pg/mL, was more than 450 times lower than that obtained using an electrochemical anti-PRL/AuNPs/poly-L-lysine/GCE immunosensor in a sandwich configuration with poly(*o*-phenylenediamine)-carried AuNPs functionalized with HRP-anti-PRL as signal tags [Chen, 2012], and much better than the LOD value achieved with a magnetoimmunosensor using anti-PRL-biotin-strept-MBs, 3.74 ng/mL [Moreno-Guzmán, 2011]. Probably, this enhanced analytical performance of the dual immunosensor was related with the excellent electrochemical behavior of dopamine at the screen printed electrodes modified with PEDOT/MWCNTs hybrids together with the efficient immobilization of the antibodies on the surface confined AuNPs.

The reproducibility of the DP voltammetric measurements was evaluated by carrying out repetitive assays on the same day and on different days for solutions containing 1 ng/mL hGH or PRL. RSD values of 3.5 and 2.7%, respectively, were obtained for the measurements performed on the same day, whereas these values were 4.0 and 4.8% when the measurements were made on different days. Also, the storage stability of the anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE and anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE immuno-conjugates was evaluated. Several immunosensors were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4 °C. Then, they were used in different days to measure the voltammetric responses of hGH and PRL in the 1 - 500 ng/mL concentration range. The results obtained revealed that these responses remained inside the control limits set at ± 3 times the standard deviation of five initial measurements for 4 days, in the case of hGH, and 7 days for PRL.

Various potentially interfering substances, progesterone, cortisol, testosterone and follicle stimulating hormone (FSH) were tested by measuring DP voltammetric responses from dopamine solutions with the dual immunosensor in the presence and in absence of target analyte. In all cases, the differences in current measured were similar to those obtained for solutions with no hGH or PRL indicating that no apparent interference from the tested hormones occurred. Moreover, other electroactive species such as uric acid (UA) and ascorbic acid (AA), which are able to be oxidized at relatively low potential values, and are also present in biological fluids, were studied. No significant oxidation signals were obtained for these compounds in the potential values range where the oxidation peak of dopamine appeared and, therefore, no interference can be expected from these substances in the determination of hGH and PRL at the label-free immunosensor. Furthermore, the possible crosstalk between the two adjacent working modified SPCEs in the dual configuration was evaluated by comparing DP voltammograms for 0.5 mM dopamine recorded at the anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/ SPCE2 where 100 ng/mL hGH were deposited, and at the anti-hGH-AuNPs/PEDOT/ MWCNTs/SPCE1 with 100 ng/mL PRL, with those obtained without target analyte at both immunosensors. No significant differences in the dopamine voltammetric responses at each immunosensor were found in the presence and in absence of the non-target antigen, thus demonstrating that no appreciable cross-talking occurred with the developed dual immunosensor.

The usefulness of the dual immunosensor for the multiplexed analysis of hGH and PRL in real samples was evaluated by analyzing human serum spiked with the hormones at three concentration levels, 1, 20 and 50 ng/mL hGH, and 1, 20 and 200 ng/mL PRL. These concentration values can be typically found in real samples. In order to verify a possible matrix effect, calibration graphs for hGH and PRL were constructed by appropriate dilution of the reconstituted spiked serum. The linear ranges of these calibration plots provided slope values of $1.0 \pm 0.3 \mu\text{A}$ (hGH) and $1.37 \pm 0.01 \mu\text{A}$ (PRL) for serum and $0.9 \pm 0.3 \mu\text{A}$ (hGH) and $1.3 \pm 0.1 \mu\text{A}$ (PRL) for saliva, which were similar to those obtained with hGH and PRL standard solutions: 1.01 ± 0.01 and $1.35 \pm 0.05 \mu\text{A}$, respectively. The application of the Student's t-test for a significance level of 0.05 demonstrated that no significant differences existed between the slope values and, therefore, the determination of hGH and PRL could be accomplished by interpolation of the changes observed in the i_p values into the calibration plots constructed with hGH and PRL standard solutions. Recoveries ranging between 98 ± 2 and $102 \pm 1 \%$ for hGH and 99 ± 1 to $103 \pm 3 \%$ for PRL were obtained in serum, and 97 ± 3 and 101 ± 4 (hGH) and 96 ± 1 to 102 ± 4 for PRL in saliva. All these results demonstrated clearly the usefulness of the developed dual immunosensor for the simultaneous analysis of hGH and PRL hormones at low concentration levels both in human serum and saliva with practically no sample treatment.

1.2.5. Electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of hGH using magnetic microparticles functionalized with tosyl groups and a screen-printed gold electrodes

In this work, an electrochemical magnetoimmunosensor was described for the first time for the determination of hGH. It involved the use of tosyl-activated magnetic microparticles (TsMBs) to covalently immobilize a monoclonal mAbhHG antibody by reacting tosyl groups with the amine moieties in the protein. A sandwich-type immunoassay with a secondary pAbhGH antibody and anti-IgG labelled with alkaline phosphatase (anti-IgG-AP) was employed. TsMBs/mAbhGH/hGH/pAbhGH/anti-IgG-AP conjugates were deposited onto the surface of a screen-printed gold electrode using a small neodymium magnet, and electrochemical detection was performed by square-wave voltammetry upon the addition of 4-aminophenyl phosphate as the AP substrate.

All the variables involved in the preparation of immunoconjugates and in the immunoassay protocol were optimized. These were the type and concentration of the alkaline phosphatase substrate to monitor the occurring immunoreaction, the time allowed for the enzyme reaction to proceed, the type of screen-printed electrode to detect the electrochemical current, the electrochemical technique and its characteristic parameters, the time for the enzyme reaction with alkaline phosphatase, the amount of mAbhGH–TsMBs conjugate immobilized on the SPAuE, and the loading and time for immobilization of AP-anti-IgG.

A calibration curve for hGH was constructed with a linear range between 0.01 and 100 ng/mL ($r = 0.998$). The lower part of this range involves much lower concentrations than those achieved with a SPR immunosensor, 18 - 542 ng/mL [Treviño, 2009]. Furthermore, a limit of detection of 0.005 ng/mL was calculated with the standard deviation of the signals provided ($n=10$) by 0.1 ng/mL hGH as the noise estimate. This detection limit is much lower than that reported using the SPR based methodology, 4 ng/mL. Moreover, a limit of quantification of 0.017 ng/mL was calculated as ten times the standard deviation ($n=10$) of the estimate. It must also be remarked that the developed immunosensor exhibits a lower detection limit and a much wider linear range than those achieved by conventional ELISA. Moreover, the time needed to prepare the immunosensor, 2 h and 15 min if the stored mAbhGH–TsMBs are used to do that, is similar to those reported for the commercially available ELISA kits for hGH.

This good analytical performance can be attributed to the combination of two important practical advantages: the immunoconjugate preconcentration provided by functionalized MBs and the high sensitivity inherent to the voltammetric transduction used.

The reproducibility of the voltammetric measurements was evaluated by measuring 1 ng/mL hGH solutions on the same day and on different days with different immunosensors prepared for each test. The calculated RSD values ($n=10$) were 3.0% and 7.6%, respectively, which reflects the suitability of the immunosensor preparation procedure. Furthermore, RSD was also calculated for a 0.1 ng/mL hGH concentration, yielding a value of 5.0%. Moreover, the stability of the completed immunoconjugates was also tested. In order to do that, different eppendorf tubes containing the same amount of AP-anti-IgG/pAbhGH/hGH/mAbhGH/TsMBs immunoconjugate with 1 $\mu\text{g/mL}$ hGH were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4 °C. Thereafter, the prepared conjugates were used to construct the corresponding immunosensors on SPAuEs, and the SW voltammetric response upon the addition of 4-AAP was checked during a time period of 6 days. The respective peak currents measured remained inside the control limits, set at ± 3 times the standard deviation value calculated for the whole set of experiments, for the entire period of time checked. The RSD value obtained for these measurements ($n=8$) was 7.8%, therefore demonstrating the remarkably good stability of the prepared immunoconjugates on the modified MBs.

Cross-reactivity studies with other hormones, testosterone (T), cortisol (HC) adrenocorticotropin (ACTH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were performed. SW voltammograms recorded under the optimized conditions used for hGH determination did not show any response for T, HC or ACTH. However, FSH produced a significant SWV current after the addition of 4-APP, which is probably due to the presence of hGH as impurity in the commercial FSH product. These results demonstrated that the developed magneto-immunosensor possesses a high selectivity and can be used for the determination of hGH in biological fluids.

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was tested by application to the analysis of human serum spiked with hGH at two different concentration levels, 4.0 and 0.1 ng/mL. In order to evaluate a possible matrix effect, calibration graphs were constructed from diluted serum samples with a mean slope value of 5.7 ± 0.4 , which matched perfectly well with the value calculated for hGH standard solutions (5.6 ± 0.5). Therefore, the determination of hGH in serum samples could be accomplished by the interpolation of the SW peak current measurements into the calibration plot constructed with hGH standard solutions. Five different samples containing 4.0 or 0.1 ng/mL hGH each were prepared, and their analysis with the magneto-immunosensors yielded mean concentrations of 3.9 ± 0.3 or 0.099 ± 0.002 ng/mL hGH, with mean recoveries of $96 \pm 6\%$ and $99 \pm 2\%$, respectively. These results demonstrated fairly well the usefulness of the developed immunosensor for the analysis of hGH.

1.2.6. Amperometric immunosensor for IGF1 using glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and poly(pyrrole propionic) acid (pPPA)

In this work we described for the first time an amperometric immunosensor for the determination of IGF1. As electrochemical transducer, a MWCNT-modified glassy carbon electrode on which poly(pyrrole propionic acid) was electropolymerized was used. This approach provided a high content of surface confined carboxyl groups suitable for covalent binding through carbodiimide chemistry of anti-IGF1 monoclonal antibody on the pPPA/MWCNT/GCE. A sandwich-type immunoassay using a polyclonal antibody labeled with peroxidase (HRP-anti-IGF) was employed, and the affinity reaction was monitored by adding hydrogen peroxide as the enzyme substrate and catechol as the redox mediator, and measuring the current corresponding to the reduction of 1,2-benzoquinone.

The experimental variables involved in the preparation of the pPPA/MWCNT/GCE electrode were optimized. These were the loading of MWCNTs onto GCE, the number of cycles during the electropolymerization of PPA and the monomer concentration. Then, the resulting electrodes were characterized by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Furthermore, the influence of the different variables affecting the amperometric response of the immunosensor was also evaluated. These included the applied detection potential, the loading of anti-IGF onto the pPPA/MWCNT/GCE, the incubation time for the

covalent binding of anti-IGF, the concentration of BSA used as blocking agent and the time for BSA incubation, the loading of HRP-anti-IGF and its incubation time, and the concentrations of H₂O₂ and catechol.

Once selected the optimal conditions, a calibration plot for IGF1 was obtained with the immunosensor. The range of linearity ($r^2 = 0.996$) extended from 0.5 to 1000 pg/mL IGF1 which is much wider than that reported for the only IGF1 immunosensor described in the literature which used electrochemical impedance spectroscopy [Rezaei, 2011]. Moreover, it is important to remark that this range is adequate for the determination of IGF1 in clinical samples. The limit of detection was calculated according to the criterion of three times the standard deviation of the amperometric responses ($n=10$) provided by 0.5 pg/mL IGF1 as the noise estimate. The value achieved, 0.25 pg/mL, was more than one hundred times lower than the lowest values reported for the immunoassays (30 pg/mL, approximately), and similar to that claimed for the impedimetric immunosensor (0.15 pg/mL), although no details of how it was calculated appeared in the publication. The limit of quantification was 0.8 pg/mL IGF1. This good sensitivity is probably derived from the combination of important practical advantages such as the high anti-IGF1 loading that can be immobilized on the pPPA-modified electrode and the inherent high sensitivity for the amperometric detection with MWCNT-modified electrodes.

The reproducibility of the amperometric measurements was evaluated by carrying out assays for 50 pg/mL IGF1 solutions both on the same day and on different days with different immunosensors prepared for each test. RSD values were 3.7 % ($n=5$) and 3.6 % ($n=5$), respectively, demonstrating the suitability and the reproducibility of the immunosensor preparation methodology.

The storage stability of the immunosensor was also tested. Different anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCEs were prepared on the same day, stored in a humid chamber at 4 °C, and employed to measure 50 pg/mL IGF1 on different days. A control chart was constructed setting as control limits \pm three times the standard deviation value calculated for 10 different measurements carried out on the first day. The immunosensors responses remained inside the control limits for at least 18 days, demonstrating the good stability of the constructed anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCEs immunoconjugates.

The potential interference caused by the presence of other hormones on the quantification of IGF1 with the immunosensor was also checked. The relative current values

obtained with the HRP-anti-IGF-IGF1-anti-IGF-pPPA/MWCNTs/GCE immunosensor for human growth hormone (hGH), prolactin (PRL), testosterone (Test), leptin (Lep), follicle-stimulating hormone (FSH) and ghrelin (Ghre) with the IGF1 response and the non-specific background current obtained with 0 pg/mL IGF1 were measured. All the hormones tested gave signals similar to that of the blank solution which suggested that corresponded mainly to non-specific adsorption of HRP-anti-IGF on the pPPA/MWCNTs/GCE and demonstrating the excellent selectivity of the developed immunosensor.

The applicability of the immunosensor for the determination of IGF1 in serum was demonstrated by analyzing a commercial human serum sample spiked with the hormone at the 0.01, 0.10, 1.0, 5.0 and 10.0 ng/mL concentration levels. The samples were analyzed either without sample treatment (except dilutions) or by releasing IGF1 from the serum binding proteins by reaction with acid-ethanol solution. Calibration plots for IGF1 were constructed by appropriate dilution from the untreated and treated serum. The slope values were $(22.4 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ and $(24.8 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ mA mL/mg, respectively. A statistical comparison using the Student t-test with the slope value of the calibration graph obtained with IGF1 standards, $(23.8 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ mA mL/mg, showed that no significant differences between the slopes values existed. Therefore, no relevant matrix effects were apparent and the determination of IGF1 in human serum could be carried out by interpolation of the sample amperometric measurements into the standards calibration plot. Recoveries were satisfactory, regardless of whether the samples were treated or not with acid-ethanol reagent. The percentages ranged between 97 ± 2 and 105 ± 3 (untreated) and 96 ± 3 102 ± 1 (treated), with RSD values between 1% and 6% for untreated samples and between 0.02% and 6% for treated samples.

All these results allowed concluding that the used immobilization scheme together with a sandwich-type immunoassay and an enzyme amplified electrochemical transduction provided excellent analytical performance of the immunosensor in terms of sensitivity, selectivity and stability, and demonstrated the suitability of the immunosensor for the determination of low IGF1 concentrations in human serum samples with practically no sample treatment.

1.2.7. Voltammetric immunosensor for PRL using glassy carbon electrodes modified with MWCNTs and pPPA.

A novel electrochemical immunosensor for the determination of the hormone prolactin (PRL) was reported by using glassy carbon electrodes modified with a poly(pyrrolepropionic acid) / multiwalled carbon nanotubes hybrid nanomaterial as transducer. An indirect competitive assay was utilized where the antigen (PRL) was covalently immobilized on the modified electrode and a fixed amount of anti-PRL labelled with alkaline phosphatase (AP) was reacted with PRL in the sample. After attachment of the remaining labelled antibody to the immobilized PRL, the affinity reaction was monitored by differential pulse voltammetry of the AP enzyme reaction product using 1-naphtyl phosphate as substrate.

The different steps involved in the preparation of the immunosensor as well as the experimental variables affecting the electrochemical transduction were optimized. These variables were the PRL loading and the reaction time and temperature for covalent binding onto pPPA/MWCNTs/GCE, the type, loading and incubation time used in a blocking step to avoid unspecific adsorptions, the concentration of AP-anti-PRL used in the competitive immunoassay, the reaction time and temperature for the AP-anti-PRL-PRL immunoreaction, and the experimental conditions (type and concentration of substrate, and time) for the AP enzyme reaction.

A calibration plot for the determination of PRL was constructed. As corresponds to the competitive immunoassay used, the peak current values decreased as PRL concentration increased. A wide linear range between 10^{-2} and 10^4 ng/mL ($r = 0.9990$) was obtained. A large difference in current, of about $10 \mu\text{A}$, was observed between the lowest and the highest analyte concentration in the linear range of the calibration curve. It is also important to remark that this linear range is appropriate for the determination of PRL in serum and urine and, that it is significantly wider than the dynamic ranges reported for the usual ELISA kits commercially available. This advantage can be also extended to the other immunosensors for PRL described in the literature. As an example, the magnetoimmunosensor reported previously by our group exhibited a linear range between 10 and 2000 ng/mL [Moreno-Guzmán, 2011].

The limit of detection was calculated as the protein concentration producing a voltammetric response equal to that from the blank minus three times the standard deviation of the blank ($LOD = i_p(\text{blank}) - 3s_b$). The s_b value, $\pm 0.07 \mu\text{A}$, was calculated from 10 successive measurements obtained from solutions prepared with no PRL and, accordingly, the obtained LOD value was 3 pg/mL. This value was remarkably lower than those reported previously using the magnetoimmunosensor, 3.74 ng/mL [Moreno-Guzmán, 2011], as well as using a configuration based on poly(o-phenylenediamine)-carried nanogold (GPPD) particles functionalized with HRP-anti-PRL, 0.1 ng/mL [Chen, 2012], or with a fluorometric multisensor, 1.3 ng/mL [Petrou, 2002]. Furthermore, the LOD value was also much lower than the limits of detection reported for the commercial ELISA kits, which range between 0.1 and 1.5 ng/mL, approximately. Most likely, the high sensitivity achieved with the AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE immunosensor derives from the efficient covalent immobilization of PRL on the pPPA/MWCNTs-modified electrode combined with the simple indirect competitive strategy for immunoassay and the high current signals obtained by differential pulse voltammetry at the nanostructured electrodes.

The reproducibility of the voltammetric measurements was evaluated by carrying out measurements for 0.01 ng/mL PRL solutions both on the same day and on different days with different immunosensors prepared for each test. RSD values were 2.0% ($n=5$) for the measurements performed on the same working day, and 2.6% ($n=5$) for those made on different days, which demonstrated a high reproducibility in the immunosensor preparation procedure. The storage stability of the PRL-pPPA/MWCNTs/GCE conjugates at 4 °C under humid conditions was also tested. Various bioconjugates were prepared on the same day, stored and then used to construct AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE immunosensors on different days which were used to measure 0.1 ng/mL PRL solutions. The DPV peak current values remained for five days within the range of ± 3 times the standard deviation of the measurements ($n=10$) carried out on the first day. A current decrease was observed for longer storage periods probably due to the instability of the protein covalently attached to the modified electrode surface. Although the storage stability of the conjugate is moderate, it is acceptably good to allow the storage of prepared PRL-pPPA/MWCNTs/GCE conjugates under the above mentioned conditions and their use for the preparation of the immunosensors on request.

Various species, testosterone, cortisol, estradiol, progesterone and human growth hormone, which may be present in biological fluids together with PRL were tested as potential interfering compounds. The results obtained demonstrated that no significant differences between the measured voltammetric currents existed for the blank solution and those prepared in the presence of each of the potentially interfering hormones, thus demonstrating the excellent selectivity of the PRL immunosensor.

The AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE immunosensor was applied to the determination of PRL in human serum and urine. The possible existence of matrix effects in human serum was evaluated by constructing calibration plots from this sample spiked with PRL over the 0.1 to 10 ng/mL concentration range. The statistic comparison of the equation obtained with that from PRL standard solutions indicated that no significant differences existed between the slopes and intercepts values. Therefore, the determination of PRL could be carried out by interpolation of the peak current values measured for the samples into the calibration plot constructed with PRL standard solutions. Triplicate analysis of the serum samples spiked at three different PRL concentration levels, 0.1, 1.0 and 10.0 ng/mL was carried out with recoveries ranging between $97\% \pm 3\%$ and $104\% \pm 5\%$ which show the usefulness of the developed immunosensor for the determination of this hormone in human sera with no sample treatment. Similarly good results were obtained for the analysis of urine samples. However, in this case, the initial pH value of the samples was 5. Therefore, a simple sample treatment consisting of a pH adjustment to 7.4 by addition of dilute sodium hydroxide followed by sample filtration through a 0.45 microns Nylon filter was applied. Then, the equation of the calibration plot constructed in urine containing PRL at concentrations ranging between 0.01 and 10.0 ng/mL was found to be also statistically equivalent to that obtained in human serum samples. Accordingly, the same protocol for PRL quantification could be employed. Good recoveries ranging between 100% and 103% were achieved for the analyzed urine samples spiked with PRL at 0.01, 0.1, 1.0 and 10 ng/mL concentration levels.

The synergic effect caused by coupling the ability of poly(pyrrol propionic acid) conducting polymer for the efficient immobilization of biomolecules with the ability of MWCNTs to promote electron transfer reactions allowed preparing an electrochemical immunosensor for PRL with enhanced analytical performance, in terms of sensitivity and range of linearity available, with respect to the few other PRL immunosensors reported previously in the

literature and the commercially available ELISA kits. Moreover, the protocol for the preparation of the immunosensor was simpler and more cost effective than other designs. Furthermore, this immunosensor could be applied to urine samples, which is highly relevant due to the recent proposal of urinary PRL as a biomarker for preeclampsia and related diseases and to the absence of immunoassay methods for the analysis of this type of sample. It is important to note that the high sensitivity of the developed methodology makes it possible working with diluted samples which avoided matrix effects.

1.3. MILESTONES

As a result of the research work described in this thesis, the following papers have been published:

1. V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Glucosinolate amperometric bienzyme biosensor based on carbon nanotubes-gold nanoparticles composite electrodes, *Electroanalysis*, 21 (2009) 1527-1532
2. V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, A novel hybrid platform for the preparation of disposable enzyme biosensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodeposition in an ionic liquid medium onto gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 656 (2011) 152–158
3. V. Serafín, N. Úbeda, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Ultrasensitive determination of human growth hormone (hGH) with a disposable electrochemical magneto-immunosensor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 939-946
4. V. Serafín, P. Hernández, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M, Pingarrón, Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode, *Electrochim. Acta*, 97 (2013) 175 -183
5. V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Electrochemical immunosensor for the determination of insulin-like growth factor-1 using electrodes modified with carbon nanotubes–poly(pyrrolepropionicacid) hybrids, *Biosens. Bioelectron.*, 52 (2014) 98-104.

6. V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrole propionic acid) / carbon nanotubes hybrid modified electrodes, *Sens. Actuators B* 195 (2014) 494–499

7. V. Serafín, G. Martínez-García, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Multiplexed determination of human growth hormone and prolactin at a label free electrochemical immunosensor using dual carbon nanotube–screen printed electrodes modified with gold and PEDOT nanoparticles, *Analyst*, 139 (2014) 4556-4563

2

Introducción y Objetivos

La determinación de biomoléculas constituye un área analítica de enorme interés en diferentes campos de la ciencia y tecnologías médica, biológica y química. Hoy en día, las dificultades asociadas a la transformación de la información biológica en una señal medible se han superado gracias al empleo de biosensores, en los que se consigue una excelente conectividad entre el ambiente biológico en el que se desenvuelve la molécula objetivo, y el transductor.

Entre los diferentes tipos de biosensores, los electroquímicos destacan debido a sus ventajas. En primer lugar, la transducción electroquímica es la forma más simple de convertir el evento biológico en una señal electrónica. Además, las propiedades inherentes a la medida electroquímica hacen posible alcanzar altos niveles de sensibilidad, rapidez de respuesta, exactitud y reproducibilidad. Por otra parte, los dispositivos electroquímicos pueden miniaturizarse con facilidad y son portátiles.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de plasmar de un modo general las características de los biosensores electroquímicos, es la enorme importancia que sobre el funcionamiento de estos dispositivos tiene la arquitectura superficial que conecta la muestra biológica con el elemento transductor, es decir, con el electrodo. Tanto el tipo de material utilizado para preparar dicha arquitectura, como su geometría y tamaño, influyen decisivamente en la respuesta del biosensor.

En esta Tesis Doctoral se ha abordado este tema, preparando superficies electródicas con diferentes materiales y estableciendo distintas estrategias de inmovilización de biomoléculas. Algunos de los diseños que se presentan constituyen la primera aportación de sensores electroquímicos para el analito de interés, y todos ellos han mejorado las características analíticas de otras metodologías, en caso de existir, demostrando ser útiles para su aplicación a muestras reales.

2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos (GEBE) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, disfrutando de una Beca de Formación del Personal Investigador asignada al Proyecto CTQ2009-12650 del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Ciencia e Innovación. Los objetivos planteados han seguido esencialmente los marcados en dicho Proyecto titulado: “Nuevas estrategias de preparación de inmunosensores electroquímicos basados en nanomateriales con aplicación a la detección de sustancias dopantes y hormonas de bajo peso molecular”, así como también algunos objetivos concretos de otros proyectos mantenidos por dicho Grupo, en particular los de referencia DPS08-07005-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y el Instituto de Salud Carlos III sobre el “Diseño de plataformas sensoras basadas en nanomateriales biocompatibles para la detección de sustancias dopantes” y, más recientemente, el CTQ2012-35041, “Nuevas estrategias de biodetección electroquímica para proteínas marcadoras de la obesidad”, del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

Siguiendo las pautas marcadas en dichos proyectos, las investigaciones realizadas se han centrado en la construcción de plataformas sensoras sensibles y selectivas para la determinación de algunas de las especies contempladas en ellos, con el fin de poner a punto métodos analíticos competitivos con otros procedimientos ya existentes. Para lograrlo se ha hecho uso de diversas estrategias de modificación electródica empleando materiales de última generación, entre los que destacan las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono, los polímeros conductores y las micropartículas magnéticas funcionalizadas. Además, se han aplicado alternativas de inmovilización de biomoléculas basadas en el atrapamiento o adsorción en materiales compósitos, así como en uniones de tipo covalente.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Preparación de un biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolato basado en el atrapamiento de las enzimas glucosa oxidasa y mirosinasa en un electrodo compósito de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y teflón.

2. Preparación de un biosensor multienzimático para creatinina basado en la inmovilización de creatinasa, creatinasa y sarcosina oxidasa sobre un electrodo compósito de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y teflón modificado con ferroceno y HRP.

3. Desarrollo de una plataforma electroquímica basada en poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) electrodepositado en medio líquido iónico sobre un electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro, para la preparación de biosensores enzimáticos de alcohol deshidrogenasa y tirosinasa.

4. Preparación de un inmunosensor sin marcador basado en un electrodo serigrafiado dual de carbono modificado con nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y de PEDOT para la determinación simultánea de hormona del crecimiento humana (hGH) y prolactina (PRL).

5. Preparación de un magnetoinmunosensor electroquímico para la determinación de hGH basado en el empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo y un electrodo serigrafiado de oro.

6. Preparación de un inmunosensor amperométrico para la determinación de factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) basado en un inmunoensayo de tipo "sandwich" empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono y ácido poli(pirrolpropiónico).

7. Preparación de un inmunosensor voltamperométrico para la determinación de prolactina (PRL) basado en un inmunoensayo competitivo indirecto empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono y ácido poli(pirrolpropiónico).

Para desarrollar el trabajo se ha seguido la metodología habitual en este tipo de investigaciones. Aunque las sistemáticas de preparación y optimización de los bioelectrodos son algo diferentes entre sí, sin embargo existen aspectos comunes que han dirigido los experimentos. Estos aspectos pueden resumirse en las siguientes tareas:

- 1.- Selección y optimización de la plataforma electródica.
- 2.- Estudios de optimización de las etapas implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor.
- 3.- Obtención de los calibrados y establecimiento de las características analíticas del método, incluyendo los parámetros de reproducibilidad, estabilidad y selectividad.
- 4.- Aplicación al análisis de muestras reales.

3

Antecedentes

3.1. EMPLEO DE BIOSENSORES EN EL ÁREA DE LA SALUD

Las propiedades analíticas únicas de los biosensores surgen de la integración de sus dos componentes esenciales: el elemento de reconocimiento biológico, prácticamente específico, y el transductor de alta sensibilidad. Junto a estas propiedades, hay que considerar también otros aspectos ventajosos, como es la rapidez de respuesta, la capacidad de miniaturización, la facilidad de uso y, sobre todo, la posibilidad de efectuar determinaciones directas en muestras complejas y a tiempo real. Idealmente, el biosensor debe responder continua y reversiblemente a la especie de interés sin alterar la muestra, eliminando de este modo la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recogida [Pingarrón, 1999]. Los biosensores proporcionan, por un lado, una integración temporal, que permite realizar un proceso de medida química directa y así obtener una señal continua y reversible, y por otro, una integración espacial, lo que favorece la miniaturización.

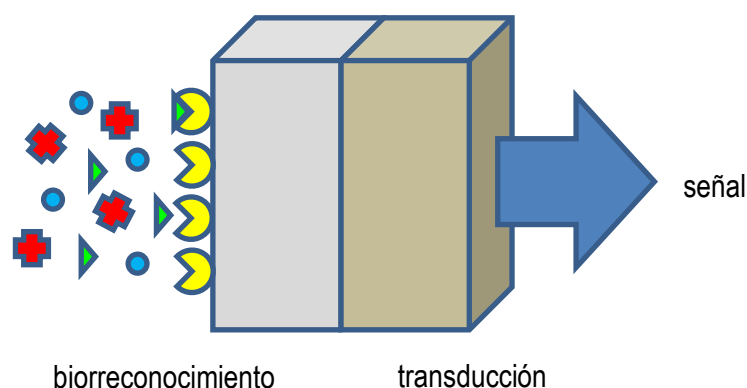


Figura 1.- Esquema de un biosensor.

La técnica instrumental en la que se basa el transductor se emplea como criterio para la clasificación de los biosensores. De entre ellos, los electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos o impedimétricos) y los ópticos (espectrofotométricos, fluorimétricos o basados en la medida de la resonancia de plasmón superficial, SPR), son los más comunes.

En los últimos años, las aplicaciones de los biosensores se han multiplicado en todas las áreas de interés analítico, destacando las relacionadas con la salud. Actualmente, el uso de biosensores afecta prácticamente a todos los tipos de determinaciones en muestras clínicas que se realizan en los campos farmacéutico y médico para el diagnóstico y el seguimiento rutinario de enfermedades, así como también a la detección de especies saludables o nocivas presentes en otros tipos de muestras, principalmente alimentos. Las especiales características de los biosensores han hecho indispensable su uso en todas aquellas aplicaciones en las que se requiere monitorizar compuestos específicos, presentes normalmente a bajas concentraciones en muestras complejas. Algunos ejemplos son los neurotransmisores o el colesterol, para los que se han descrito numerosas configuraciones y, más recientemente, los biomarcadores de enfermedades, las hormonas y sustancias dopantes y, en el área alimentaria, los microorganismos, los ingredientes funcionales o los alérgenos.

En este trabajo se han puesto a punto métodos para la determinación de cinco especies representativas de esta clase de biomoléculas, por lo que en lo que sigue se ilustrará, con ayuda de datos bibliográficos, el interés y la problemática del desarrollo de biosensores para su determinación.

3.1.1. Biosensores electroquímicos

Las importantes ventajas de este tipo de detección ha hecho que estos biosensores constituyan en la actualidad herramientas enormemente útiles para la monitorización de especies de interés bioquímico. Entre estas ventajas destaca la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas, que hace que sea posible analizar fácilmente volúmenes pequeños de muestra y su adaptación para la monitorización "in vivo". Por otro lado, los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} M, son apropiados para estas determinaciones.

Finalmente, la relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica y de su mantenimiento hacen posible el fácil acceso a estos dispositivos. Dentro de estos

biosensores, los amperométricos, y los voltamperométricos basados en las técnicas diferencial de impulsos y de onda cuadrada, de mayor sensibilidad, son los que cuentan con un mayor número de aplicaciones.

Aunque los biosensores electroquímicos enzimáticos son los más utilizados para la determinación de analitos como la glucosa o el colesterol en muestras clínicas, o la de microconstituyentes de los alimentos, sin embargo, en el área de los biomarcadores y en el control del dopaje, la mayor parte de las configuraciones desarrolladas se basan en el empleo de biosensores de afinidad, principalmente inmunosensores. Esto es debido, por una parte, a las propiedades bioquímicas de las especies que es necesario monitorizar, que cuentan habitualmente con anticuerpos específicos y, por otra, a las mejores características analíticas de este tipo de biosensores, destacando su selectividad, sensibilidad, y eficiente consumo de reactivos [Wang, 2008; Marquette, 2006]. Además, los inmunosensores electroquímicos son dispositivos fáciles de utilizar, de automatizar, digitalizar y miniaturizar [Stefan, 2000; D'Orazio, 2003]. Estas características vienen a solventar las principales desventajas de las técnicas de inmunoensayo clásicas, principalmente el elevado consumo de tiempo y la escasa precisión de las medidas.

A pesar de sus propiedades, la transferencia de los diseños de biosensores enzimáticos e inmunosensores desde los laboratorios de investigación al mercado, es todavía escasa. Los obstáculos para su explotación se encuentran, en el caso de los primeros, principalmente en la baja estabilidad de las biomoléculas, mientras que las elevadas constantes de afinidad de las reacciones inmunoquímicas, que hacen que sea muy difícil lograr la regeneración óptima de las fases sensoras, y el uso generalizado de marcadores para la obtención de la señal analítica, son los problemas a destacar en el caso de los inmunosensores [Velasco-García, 2003].

3.1.2. Técnicas de preparación

La etapa crucial en la preparación de un biosensor electroquímico es la inmovilización del biomaterial sobre la superficie electródica. Por un lado, el procedimiento elegido debe proporcionar una buena estabilidad al recubrimiento, mientras que, por otro, el bioelectrodo debe mantener una elevada conductividad eléctrica. Los materiales empleados comúnmente para la fabricación de los biosensores son oro, carbono vitrificado y pasta de carbono, modificados normalmente con otros materiales: nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y polímeros. En cuanto a los métodos de inmovilización, los más utilizados se basan en la adsorción, el atrapamiento y el establecimiento de uniones covalentes o de afinidad.

En este apartado se van a considerar exclusivamente los procedimientos utilizados para la preparación de los biosensores descritos en este trabajo

-Adsorción

La inmovilización de biomoléculas por adsorción es el método más sencillo. Consiste en poner en contacto el material biológico con el soporte electródico mediante incubación en una disolución o por deposición de una gota, durante un tiempo suficiente para que se produzcan interacciones de tipo no covalente entre los lugares activos del biomaterial y la superficie adsorbente. Estas interacciones pueden ser de diversos tipos: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. Hay que señalar que este método puede presentar graves inconvenientes derivados de la aleatoriedad de la inmovilización con respecto a los grupos funcionales implicados en la biorreacción y del carácter reversible del proceso de adsorción, por lo que cambios de pH, fuerza iónica de la disolución o temperatura, pueden provocar la desorción de la biomolécula [Pingarrón, 1999].

En los últimos años destaca el empleo de nanopartículas, principalmente metálicas y de óxidos, como modificadores electródicos capaces de mejorar las propiedades de adsorción. Muchas de las configuraciones descritas en la bibliografía utilizan nanopartículas de oro

(AuNPs), que proporcionan un notable aumento de la superficie activa del electrodo en condiciones de inmovilizar el material biológico. En estas aplicaciones, los nanotubos de carbono también poseen propiedades muy favorables para la preparación de biosensores electroquímicos, destacando su alta conductividad y elevada área superficial, además de su fuerte capacidad de adsorción.

-Atrapamiento

Una estrategia de inmovilización aplicada mayoritariamente a la preparación de biosensores enzimáticos es la basada en el atrapamiento del biomaterial en el interior de una matriz polimérica, en la propia matriz transductora o por encapsulamiento dentro de una membrana semipermeable. El atrapamiento de enzimas durante el proceso de electrodeposición de polímeros conductores electrónicos ha proporcionado excelentes resultados en este campo [Ahuja, 2007]. Asimismo, puede decirse que la fabricación de biocompuestos por inclusión física de las enzimas en la pasta del electrodo constituye una estrategia sencilla, regenerable y rápida para la preparación de biosensores electroquímicos [Serra, 2002]. En estas aplicaciones, el empleo de electrodos de pasta fabricados con materiales como los nanotubos de carbono o 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].

-Enlace covalente

La inmovilización química de biomoléculas ofrece algunas ventajas importantes frente a los métodos vistos anteriormente. Entre ellas cabe citar la mayor estabilidad y reproducibilidad de la biocapa inmovilizada sobre el sustrato electródico, la posibilidad de conseguir un alto grado de recubrimiento uniforme, la reducción del número de posibles orientaciones aleatorias que puede adoptar la proteína en la superficie del electrodo, y el riesgo mínimo de pérdida de material biológico. Sin embargo, existe una desventaja, ya que cuando las biomoléculas se enlazan covalentemente en soportes sólidos, normalmente su capacidad de enlace específica

disminuye. Las principales razones para esta reducción de actividad se deben a la orientación al azar de las biomoléculas y a la multiplicidad de posiciones de unión de la proteína con el soporte, 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].

-Magnetoimmunosensores

Desde hace algunos años se dispone comercialmente de micropartículas magnéticas funcionalizadas con diversos grupos enlazantes capaces de interaccionar con las posiciones de unión de los anticuerpos. Por ejemplo, se han utilizado micropartículas magnéticas carboxiladas y tosiladas para inmovilización covalente, así como modificadas con estreptavidina, para su uso con moléculas biotiniladas, o con proteínas A o G, para la inmovilización por afinidad. La elevada superficie activa de este material permite la inmovilización de una alta concentración de biomoléculas, lográndose diseños que poseen, en general, mejores límites de detección que las configuraciones convencionales equivalentes [Zacco, 2007]. Además, su uso 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, estas se pueden separar con ayuda de un pequeño imán y proceder a la operación de lavado.

Por otro lado, una vez preparado el inmunoconjugado completo, este puede atraparse del mismo modo sobre la superficie del electrodo. De esta forma se logra un efecto de preconcentración de inmunorreactivos en la superficie del transductor, lo que hace posible alcanzar una elevada sensibilidad y evitar los efectos matriz, así como medir volúmenes pequeños de muestra [Centi, 2007].

3.1.3. Tipos de electrodos utilizados para la construcción de los biosensores

Los biosensores desarrollados en este trabajo se basan en distintos tipos de plataformas electrónicas cuyas características, las de los materiales empleados, y las estrategias seguidas para su fabricación, se comentan a continuación.

3.1.3.1. *Electrodos compósitos de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro*

Estos electrodos se han utilizado para la construcción de dos biosensores enzimáticos, los empleados para la determinación de glucosinolato y de creatinina por incorporación de los biorreactivos correspondientes. La característica principal de este tipo de electrodos es que el material desarrollado por mezcla de los componentes constituye la plataforma conductora al completo. Como se muestra en la Figura 2, esta mezcla se utiliza directamente introduciendo la pasta en el hueco de una carcasa aislante. Una ventaja general de esta metodología es la posibilidad de incorporación de las biomoléculas a la pasta, que quedan atrapadas en un depósito tridimensional, manteniendo su estabilidad y un largo periodo de vida útil.

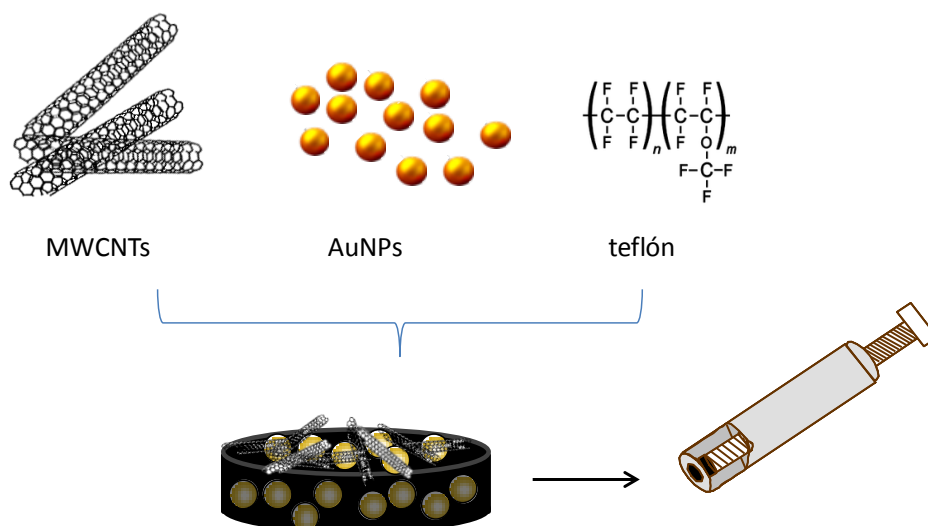


Figura 2.- Esquema general de preparación de los electrodos de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro, con teflón como aglutinante

Las propiedades únicas de los nanotubos de carbono (CNTs) han permitido mejorar las características analíticas de los biosensores enzimáticos en general y, en particular, las de los diseños basados en mezclas compósitas. La escasa solubilidad de este material en los disolventes comunes y la pérdida de sus propiedades cuando se aplican esquemas de funcionalización covalente, hacen que la preparación de transductores electroquímicos basados en pastas de CNTs, resulte muy adecuada. Estos dispositivos mantienen las propiedades de los electrodos de pasta de carbono convencionales (CPEs), principalmente la posibilidad de incorporar distintas sustancias (mediadores redox, biomoléculas) a la pasta, o las bajas corrientes de fondo que se alcanzan, unidas a la fácil renovación de la superficie sensora mediante pulido. Pero además, los nanotubos de carbono muestran un excelente comportamiento electroquímico promoviendo reacciones de transferencia electrónica y exhibiendo una actividad electrocatalítica intensa frente a las reacciones de oxidación de peróxido de hidrógeno o de NADH, que son especies implicadas en muchas reacciones enzimáticas. Los electrodos basados en nanotubos de carbono presentan una alta sensibilidad, resistencia mecánica, y una característica pasividad frente al ensuciamiento superficial.

Por otro lado, la utilización de las nanopartículas de oro (AuNPs) en el campo del bioanálisis ha venido incrementándose rápidamente en las dos últimas décadas, pudiendo considerarse hoy en día un material esencial para la construcción de biosensores electroquímicos [Pingarrón, 2008]. Estas partículas se caracterizan por proporcionar un microambiente adecuado para la inmovilización de biomoléculas sin pérdida de su actividad biológica, al tiempo que facilitan la transferencia electrónica entre las proteínas inmovilizadas y la superficie del electrodo, propiedades que han provocado el uso intensivo de este nanomaterial para la preparación de configuraciones que poseen mejores características analíticas que otros diseños de biosensores. Entre los diversos modos de preparación de electrodos estructurados con nanopartículas de oro, el basado en la formación de matrices conductoras por incorporación de dichas partículas a una mezcla compósita, puede considerarse uno de los más sencillos ya que, por ejemplo, no es necesario optimizar y controlar aspectos experimentales como el tiempo o el potencial de electrodeposición, proporcionando además, superficies altamente reproducibles. Esta modalidad cuenta con un buen número de aplicaciones, en las que la

nanopartículas de oro se incorporan a la mezcla compósita por adición de un pequeño volumen de una suspensión de oro coloidal de tamaño de partícula controlado.

En la Tabla 1 se han resumido algunos ejemplos representativos de sensores y biosensores electroquímicos enzimáticos preparados con electrodos estructurados con nanopartículas de oro y distintos materiales de carbono, cuya configuración está, por tanto, relacionada con el tipo de diseño utilizado en este trabajo.

Según se observa, los primeros electrodos empleaban grafito en polvo mezclado con oro coloidal y con aceite mineral como aglutinante. Este modelo ha permitido fabricar diferentes biosensores de peroxidasa [Liu, 2002], tirosinasa [Liu, 2003] o glucosa oxidasa [Liu, 2003a], en los que el atrapamiento de las enzimas en la matriz, en presencia de las nanopartículas de oro, proporciona una mayor estabilidad y facilidad para la transferencia electrónica, haciendo posible la determinación del analito correspondiente en ausencia de mediador. También se han preparado biosensores de proteínas con actividad como pseudo-peroxidasas. Es el caso del citocromo c [Ju, 2002], la mioglobina [Liu, 2003b] y la hemoglobina [Xu, 2010]. Por otro lado, se comprobó que la sustitución del aceite por polvo de teflón mejoraba la resistencia del material, lográndose mayor capacidad de renovación por pulido y de resistencia al hinchamiento [Carralero, 2006]. Finalmente, el uso de líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs) como material aglutinante proporciona ventajas adicionales debido a la amplia ventana de potencial que ofrecen estos medios y a su elevada conductividad y estabilidad [Franzoi, 2009; Liu, 2010].

En nuestro grupo de investigación comenzó a utilizarse la mezcla de nanotubos de carbono y AuNPs para poner a punto biosensores enzimáticos de glucosa oxidasa [Manso, 2007] y de alcohol deshidrogenasa [Manso, 2008], con respuestas de corriente más intensas que las de otras configuraciones. Asimismo, se empleó el líquido iónico OPPF₆, por primera vez, para la preparación de un sensor de tamaño micrométrico para cortisol, así como de un microbiosensor basado en la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD) para la determinación de androsterona [Moreno, 2013].

Tabla 1.- Sensores y biosensores enzimáticos electroquímicos basados en electrodos de pasta de carbono y nanopartículas de oro.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito / Muestra	Ref.
Cytc / AuNPs / C / ac. parafina	CV, $E_{det} = 0.0$ V	I.L. 1.0 μ M - 1.0 mM	H ₂ O ₂	Ju, 2002
HRP / AuNPs / C / ac. parafina	Amp., $E_{det} = -0.4$ V	I.L. 0.48 - 50 μ M; LOD, 0.21 μ M	H ₂ O ₂	Liu, 2002
Tyr / AuNPs / C / ac. parafina	Amp., $E_{det} = -0.15$ V	I.L. 4 - 48 μ M; LOD, 6.1 nM	fenol	Liu, 2003
GOx_{ad} / AuNPs / C / ac. parafina	Amp., $E_{det} = -0.5$ V	I.L. 0.04 - 0.28 mM; LOD, 0.01 mM	glucosa / suero	Liu, 2003a
Mb / AuNPs / C / ac. parafina	Amp., $E_{det} = -0.95$ V	I.L. 8.0-112 μ M; LOD, 0.7 μ M (NO ₂ ⁻)	H ₂ O ₂ , NO ₂ ⁻	Liu, 2003b
PPO / AuNPs / alb. / C / ac. min	Amp., $E_{det} = -0.1$ V	LOD, 0.2 μ M	dopamina	Miscoria, 2005
Tyr / AuNPs / C / t eflón	Amp., $E_{det} = -0.10$ V	LOD, 3 nM (catecol)	fenoles / aguas	Carralero, 2006
XOD / AuNPs / GCMPs / ac. min.	Amp., $E_{det} = +0.7$ V	I.L. 0.5 -10 μ M (X); 5 - 150 (Hx)	Hx / atún en conserva	Çubukçu, 2007
GOx / AuNPs / MWCNTs / teflón	Amp., $E_{det} = +0.5$ V	I.L. 0.05 -1 mM; LOD, 17 μ M	glucosa / bebidas	Manso, 2007
ADH / AuNPs / MWCNTs / teflón	Amp., $E_{det} = +0.3$ V	I.L. 0.02 -1 mM; LOD, 4.7 μ M	etanol / cerveza	Manso, 2008
Lac / Chit-CC / C / Nújol / AuNPs / BMISPF₆	SWV	I.L. 0.099-5.825 μ M; LOD, 0.028 μ M	luteolina / camomila	Franzoi, 2009

CLAVE: Cyt c, citocromo c; AuNPs, nanopartículas de oro; C, grafito; ac., aceite; CV, voltamperometría cíclica; I.L., intervalo lineal; HRP, peroxidasa; Amp., amperometría; LOD, límite de detección; Tyr, tirosinasa; GOx_{ad}, glucosa oxidasa adsorbida; Mb, mioglobina; PPO, polifenoloxidasa; alb., albúmina; ac. min., aceite mineral; XOD, xantina oxidasa; GCMPs, micropartículas de carbono vitrificado; X, xantina; Hx, hipoxantina; ADH, alcohol deshidrogenasa; Lac, lacasa, Chit-CC, cloruro, cianúrico entrecruzado con quitosan; BMISPF₆, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio; SWV, voltamperometría de onda cuadrada.

Tabla 1 (Cont.).- Sensores y biosensores enzimáticos electroquímicos basados en electrodos de pasta de carbono y nanopartículas de oro.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito/Muestra	Ref.
GOx/AuNPs/C/OPPF ₆	Amp., E _{det} = +0.8 V	I.L. 5.0 - 1200 μM; LOD, 3.5 μM	glucosa / suero	Liu, 2010
Hb _{ad} /AuNPs/C/ac. parafina	Amp., E _{det} = -1.0 V	I.L. 0.9 - 300 μM; LOD, 0.1 μM	óxido nítrico	Xu, 2010
AuNPs/C/ac. parafina	DPV	I.L. 0.01 - 80.0 μM; LOD, 7.1 nM	acetazol / suero, orina	Gholivand, 2011
AuNPs/MWCNTs/OPPF ₆	SWV	I.L. 0.1 - 10 ng/mL; LOD, 15 pg/mL	cortisol / orina, suero	Moreno, 2011
D50wx2/AnNPs/GCMPs/ac. min.	AdsSWV	I.L. 0.0334-42.2 μM; LOD, 4.71 nM (acet.)	acet., tram./ tabletas, suero, orina	Sanghavi, 2011
AuNPs/C/ac. parafina	DPV (acumulación)	I.L. 0.05-1.6 μM; LOD, 0.002 μM (tartraz.)	colorantes / zumos	Ghoreishi, 2012
AuNPs/C/ac. parafina	SWV	I.L. 0.48 - 50 μM; LOD, 0.21 μM	H ₂ O ₂	Arvand, 2013
3α-HSD/AuNPs/ MWCNTs/OPPF ₆	Amp., E _{det} = +0.3 V	I.L. 0.1-120 μg/mL; LOD, 89 ng/mL	androsterona / suero	Moreno, 2013
AuNPs/rGO/C/ac. min.	AdsSWV	I.L. 0.3 μM-0.114 nM; LOD, 0.04 nM	ATP vía FAD / suero, frutas, semillas	Sanghavi, 2013

CLAVE: OPF₆, hexafluorofosfato de octadecilpiridinio; Hb_{ad}, hemoglobina adsorbida; DPV, voltamperometría diferencial de impulsos; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared, múltiple; BMISPF₆, SWV, voltamperometría de onda cuadrada; D50wx2, resina de intercambio Dowex; tram., tramalol; 3α-HSD, 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa; rGO, óxido de grafeno reducido; AdsSWV, voltamperometría de onda cuadrada con redisolución adsortiva; ATP, adenosin trifosfato; FAD, flavinadenin dinucleótido

3.1.3.2. Electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro y poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) electrodepositado en medio líquido iónico.

Como es sabido, los polímeros conductores electrónicos poseen interesantes propiedades electroquímicas, principalmente una alta conductividad intrínseca, que derivan de la extensa conjugación π a lo largo de su esqueleto [Ahuja, 2007]. Dicha conductividad únicamente aparece cuando el material se encuentra dopado con iones de pequeño tamaño, y se produce al oxidar química o electroquímicamente, dando lugar a la formación del polímero cargado positivamente que se neutraliza con los aniones del medio. Por ejemplo:



donde X^- representa el anión de la sal usada como electrólito soporte. Este proceso viene acompañado de variaciones en los espectros de absorción y de cambios de volumen [Carlberg, 1996]. En la electropolimerización electroquímica, el proceso de obtención del polímero a partir del monómero y el dopado tienen lugar simultáneamente. Cuando en la disolución del monómero está presente una enzima, esta puede quedar atrapada en la red polimérica, lo que proporciona un método muy atractivo para la preparación de biosensores enzimáticos debido a su sencillez y a que proporciona biomateriales que se caracterizan por la homogeneidad de la distribución de la enzima [Ahuja, 2007].

El polímero conductor utilizado en estos trabajos, PEDOT, (poli(3,4-etilendioxitiofeno) (Figura 3) posee una elevada estabilidad electroquímica, alta conductividad y un bajo potencial de oxidación del monómero. Sin embargo, a pesar de estas características, ha sido poco utilizado en la preparación de biosensores [Groenendaal, 2000]. Probablemente, esto se debe a que el agua no es el disolvente adecuado para la polimerización de su monómero, EDOT, poco soluble, así como también a que las moléculas de agua interactúan con el producto intermedio de la reacción de polimerización.

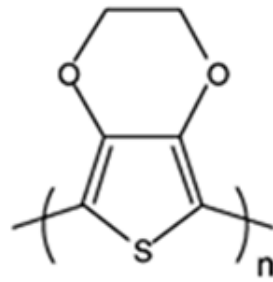


Figura 3.- Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT).

Debido a estos inconvenientes, el PEDOT se sintetiza normalmente a partir de su monómero en medio acetonitrilo [Melato, 2008] o en presencia de tensoactivos en disolución acuosa [Efimov, 2001]. También se ha investigado el empleo de líquidos iónicos (ILs) como medios adecuados para la polimerización, observándose que estos aceleran el proceso y mejoran la morfología y la conductividad del polímero resultante [Wagner, 2005]. Naturalmente, cuando se pretende desarrollar una plataforma biosensora por atrapamiento de enzimas, es necesario asegurarse de que la actividad enzimática se mantiene en estos medios.

El empleo de nanocompuestos poliméricos por combinación de los polímeros conductores con nanopartículas metálicas, sobre todo de oro, mejora las propiedades de la superficie sensora, debido al efecto sinérgico o complementario que surge de la combinación de ambos materiales [Rajesh, 2009]. En la Tabla 2 se recogen algunos ejemplos de sensores y biosensores electroquímicos basados en el empleo de superficies modificadas con PEDOT, en presencia o ausencia de nanopartículas metálicas, o de enzima.

Tabla 2.- Sensores y biosensores enzimáticos basados en electrodos modificados con PEDOT o con PEDOT/AuNPs.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito / Muestra	Ref.
PEDOT / GCE	SWV / redisolución	I.L. 0.10 - 72.6 $\mu\text{g/L}$; LOD, 0.09 - 1.0 $\mu\text{g/L}$	pesticidas (DCF) / suelos	Manisankar, 2005
AuNPs / PEDOT / GCE	Amp. 0.2 V	I.L. 3 - 20 nM; LOD, 2 nM	dopamina	Kumar, 2005
MIP-PEDOT / ITO	Amp., $E_{\text{det}} = 0.75 \text{ V}$	I.L. 0.1 - 1 mM; LOD, 0.2 mM	morfina	Yeh, 2005
(GOx) / PEDOT / PtE	Amp. 0.35 V	I.L. 0.1 - 10.0 mM; LOD, 0.13 mM	glucosa	Nien, 2006
PEDOT / PtE	DPV, $E_{\text{det}} = -0.07 \text{ V}$	I.L. 4 - 200 $\mu\text{g/mL}$; LOD, 1.85 $\mu\text{g/mL}$	ácido ascórbico	Bello, 2007
(ADH) / AuNPs / PEDOT-PSS / ITO	Amp., $E_{\text{det}} = -0.95 \text{ V}$	I.L. 0.1-2.2 μM (NADH); 1-100 μM (etanol)	NADH; etanol	Manesh, 2008
AuNPs / PEDOT / GCE	DPV	I.L., μM : 500-3500, AA; 20-80, DA; 20-180, UA	AA, DA, UA	Mathiyarasu, 2008
(GOx) / PEDOT / PdNPs / GCE	Amp. 0.4 V	I.L. 0.5-30 mM	glucosa / suero	Santosh, 2009

Clave: DCF, dicofol; MIP, polímero de impresión molecular; ITO, electrodo de indio y óxido de estaño; PSS, polisulfona sulfato; PdNPs, nanopartículas de paladio; AA, ácido ascórbico; DA, dopamina; UA, ácido úrico.

Tabla 2 (Cont.)- Sensores y biosensores enzimáticos basados en electrodos modificados con PEDOT o con PEDOT/AuNPs.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito / Muestra	Ref.
(AlcOx) / PEDOT / GCE	Amp.	I.L. 0.2 - 1.5 mM	etanol / bebidas	Turkarslan, 2010
PEDOT / PtE	LSV	I.L. 0.5 - 25 μ M; LOD, 61 nM	dopamina / orina	Atta, 2011
PtNPs / PEDOT / SPCE	Amp. -0.55V	I.L. hasta 6 mM; LOD, 1.6 μ M	H ₂ O ₂	Chang, 2012
PEDOT / GCE	DPASV	I.L. 0.075-7.5 μ M; LOD, 10.9 nM	niclosamida / tabletas, orina	Mehretie, 2012
PEDOT / AuE	CV	I.L. 0.08 - 20 μ M; LOD, 0.0267 μ M	roxitromicina / cápsulas	Zhang, 2012
DNA-SH-AuNPs / PEDOT / AuE	Amp. -0.4 V	I.L. 150 pM-1 mM	HRP-DNA S. Aureus	Spain, 2013
(GOx)PEDOT / NPG	Amp. 0.2 V	I.L. 0.1 - 15 mM; LOD, 10 μ M	glucosa	Xiao, 2013
PEDOT(PSS) / PtE	CV	I.L. 10nM-6.5 mM; LOD, 3 nM	ácido cafeico / vino	Bianchini, 2014

Clave: AlcOx, alcohol oxidasa; PtNPs, nanopartículas de platino; DPASV, voltamperometría de redisolución anódica en diferencial de impulsos; NPG, oro nanoporoso.

Como puede verse, los electrodos modificados con PEDOT se han empleado como sensores y biosensores enzimáticos para la determinación de una variedad de compuestos mayoritariamente orgánicos. También se ha desarrollado un genosensor por inmovilización de ADN tiolado [Spain, 2013], y un sensor basado en el empleo del polímero como MIP para la determinación de morfina [Yeh, 2005]. Utilizando electrodos de carbono vitrificado modificados con PEDOT se han puesto a punto dos métodos de redisolución. En un caso, empleado la técnica de redisolución adsortiva, los analitos se acumularon a un potencial próximo a 0 V, registrándose los voltamperogramas de reducción en onda cuadrada [Manisankar, 2005] y, en el otro caso, se utilizó la técnica de redisolución anódica para la determinación de un medicamento, la niclosamida [Mehretie, 2012]. Otros electrodos modificados con PEDOT se han empleado para la determinación de ácido ascórbico [Bello, 2007], de roxitromicina [Zhang, 2012] o dopamina [Atta, 2011]. Como ejemplo de un biosensor enzimático puede citarse el bioelectrodo de alcohol oxidasa (AlcOx) preparado por electrodeposición del polímero sobre un electrodo de platino sumergido en una disolución de la enzima en medio dodecilsulfato sódico (SDS) [Turkarlan, 2010].

Como se ha indicado, varias configuraciones contienen, además, nanopartículas metálicas, principalmente de oro, pero también de platino o paladio, así como oro nanoporoso (NPG) [Xiao, 2013]. Un sensor preparado por modificación de un electrodo de carbono vitrificado modificado con PEDOT y AuNPs se utilizó para poner a punto un método de determinación simultánea de ácido ascórbico, dopamina y ácido úrico [Mathiyarasu, 2008]. Otro, con nanopartículas de platino se empleó para la detección de peróxido de hidrógeno [Chang, 2012]. También se han empleado estas superficies nanoestructuradas para incorporar enzimas como la glucosa oxidasa o la alcohol deshidrogenasa, desarrollando biosensores para los sustratos correspondientes [Manesh, 2008; Santosh, 2009; Nien, 2006].

3.1.3.3. *Electrodos serigrafados de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro y de poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)*

La combinación de polímeros conductores y nanotubos de carbono recibe desde hace tiempo un interés especial, debido a que el material híbrido resultante posee las propiedades de ambos componentes mejoradas por el efecto sinérgico de la mezcla. Su empleo en la modificación de electrodos da lugar frecuentemente a efectos electrocatalíticos intensos con respuestas de mayor magnitud que con los materiales individuales. Por otro lado, en las aplicaciones para la construcción de biosensores, se suma a estas ventajas la posibilidad de utilizar diferentes alternativas para la inmovilización de biomoléculas, bien por adsorción o atrapamiento físico, o mediante enlace covalente [Rajesh, 2009]. Además, la incorporación de nanopartículas de oro incrementa la capacidad de carga efectiva de biomoléculas al tiempo que atenúa la pérdida de actividad biológica debida a la inmovilización, contribuyendo también a acelerar la velocidad de transferencia electrónica.

En la configuración desarrollada en este trabajo, además de los dos nanomateriales, CNTs y AuNPs, se empleó el polímero PEDOT en forma de nanopartículas, con el fin de aprovechar la mayor conductividad y la mayor rapidez de los procesos de “switching” (paso del estado no conductor al conductor) que presentan los polímeros conductores nano-dimensionales [Innis, 2002]. En efecto, estos nanomateriales poliméricos exhiben mejores propiedades que los polímeros convencionales debido a su mayor área superficial [Rajesh, 2009]. También destaca su bajo coste, fácil preparación y posibilidad de producción a escala, con diferentes tamaños de partícula, y/o inclusión de funciones específicas. En el caso del PEDOT, sus nanoestructuras se preparan de diversas formas. Por ejemplo, pueden sintetizarse por polimerización en presencia de tensoactivos, en medios emulsionados, o empleando plantillas [Hosseini, 2014].

La Tabla 3 resume algunos ejemplos de aplicaciones de electrodos modificados con PEDOT y nanotubos de carbono, así como también, los basados en diferentes nanomateriales del polímero.

Tabla 3.- Sensores y biosensores enzimáticos basados en electrodos modificados con PEDOT/CNTs o con nanomateriales de PEDOT.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito / Muestra	Ref.
(GOx)PEDOT / PB / MWCNTs / SPCE	FIA-Amp. -0.1 V	I.L. 1-10 mM	glucosa / suero	Chiu, 2009
PEDOT / MWCNTs / SPCE	Amp. 0.6 V	I.L. hasta 0.5 mM; LOD, 0.96 μ M	nitrito / agua	Lin, 2009
MWCNTs-PEDOT / GCE	Amp. -0.5 V	I.L. 0.1-9.8 mM	H ₂ O ₂	Lin, 2010
Nf / AscOx / PEDOT / SWCNTs / PtE	Amp. 0.4 V	I.L. 1 μ M-18 mM; LOD, 0.7 μ M	ác. ascórbico	Liu, 2011
PEDOTnw / AuNPs / Hb / GCE	Amp. -0.3 V	I.L. 1-1100 μ M; LOD, 0.6 μ M	H ₂ O ₂ / líquido lentillas	Chen, 2013
PEDOT / MWCNTs / CPE	DPV	I.L. 0.1-40 μ M; LOD, 20 nM	dopamina	Xu, 2013
Pd-PEDOTn / GCE	Amp. -0.1 V	I.L. 0.04-9 mM; LOD, 1.6 μ M	glucosa / suero	Hosseini, 2014
PEDOT / MWCNTs / GCE	LSV	I.L. 0.01-25 μ M	magnolol / plantas	Zhang, 2014

Clave: PB, azul de Prusia; SPCE, electrodo serigrafiado de carbono; PEDOTnw, "nanowhiskers" (nanobigotes) de PEDOT; Hb, hemoglobina; Nf, Nafion; AscOx, ascorbato oxidasa; PEDOTn, nanoesferas de PEDOT; CPE, electrodo de pasta de carbono

Según se aprecia, se han encontrado pocas aplicaciones de electrodos modificados con PEDOT y nanotubos de carbono. Como ejemplo representativo cabe citar un sensor para la determinación de bajas concentraciones de nitrito, construido por electropolimerización de PEDOT sobre un electrodo serigrafiado modificado con CNTs en presencia de (2-hydroxypropyl)- β -ciclodextrina. La elevada sensibilidad alcanzada se atribuye a la interacción electrostática entre el anión y la superficie electródica modificada cargada positivamente [Lin, 2009]. También puede destacarse, entre los diseños de biosensores enzimáticos, el desarrollado para glucosa empleando un electrodo serigrafiado modificado con nanotubos de carbono y azul de Prusia (PB). La electrodeposición de PEDOT sobre el electrodo PB/MWCNTs/SPCE en presencia de glucosa oxidasa, permite su inmovilización por atrapamiento. Además, en este caso, el PB refuerza el efecto electrocatalítico de los otros materiales hacia la oxidación de H_2O_2 , que se detecta mediante FIA a un potencial de -0.1 V vs Ag/AgCl [Chiu, 2009].

En cuanto a los electrodos preparados con nanomateriales de PEDOT, citar el basado en la modificación con nanofibras del polímero y nanopartículas de paladio (Pd-PEDOTn). Las nanofibras se obtienen por oxidación del monómero con Fe(III) en medio HCl. El tratamiento posterior de estas fibras por reducción con borohidruro en presencia de Pd(II), da lugar a la formación de nanopartículas de Pd en el interior de las mismas. Sobre el material resultante es posible observar la oxidación electroquímica directa de la glucosa en medio NaOH 0.1 M, desarrollándose así un sensor no enzimático para este compuesto [Hosseini, 2014]. Como ejemplo de biosensores, destaca una configuración preparada por modificación de un electrodo de carbono vitrificado con “nanowhiskers” (nanobigotes) de PEDOT. Para sintetizar estas nanoestructuras, el monómero se polimeriza en medio líquido iónico ([bmim][BF₄]), obteniéndose un material en forma alargada con un espesor muy fino, de hasta 0.2 nm. En presencia de hemoglobina, los “nanowhiskers” actúan como puentes de transferencia electrónica entre el centro activo de la proteína y la superficie electródica. Aprovechando esta propiedad, se construyó un biosensor para H_2O_2 sin mediador, basado en la medida de la transferencia electrónica directa de la biomolécula [Chen, 2013]

3.1.3.4. *Electrodos de carbono vitrificado modificados con nanotubos de carbono y ácido poli(pirrolpropiónico)*

Como se ha señalado, el atrapamiento de biomoléculas en la red polimérica durante la etapa de polimerización constituye un método simple y eficaz de inmovilización en una sola etapa. Sin embargo, este procedimiento presenta el inconveniente de que los analitos tienen difícil acceso a las regiones activas del biosensor y, además, no es posible lograr una adecuada orientación de las proteínas. Esto dificulta enormemente la preparación de inmunosensores. Una alternativa para minimizar los problemas anteriores consiste en emplear materiales poliméricos con grupos funcionales adecuados, susceptibles de ser utilizados para crear uniones covalentes. Entre las diferentes posibilidades, destacan las que ofrecen el polipirrol (pPy) funcionalizado y sus derivados. Uno de estos polímeros es el ácido poli(pirrolpropiónico) (pPPA), utilizado en este trabajo para el desarrollo de dos inmunosensores electroquímicos. Este compuesto (Figura 4) posee un elevado número de funciones carboxílicas capaces de formar uniones de tipo amida con los grupos amino de las proteínas [Dong, 2006]. Por otro lado, la naturaleza hidrofílica del pPPA facilita la difusión de las moléculas de analito al interior de la película polimérica, incrementándose así la magnitud de la corriente en la superficie del electrodo. Sin embargo, la baja conductividad del pPPA en comparación con la de otros polímeros conductores como el pPy es un inconveniente que hace que se alcancen relaciones señal/ruido inferiores a las que cabría esperar. Debido a esto, la preparación de materiales híbridos con nanotubos de carbono tiene un gran interés, ya que permite aprovechar las ventajas del polímero al tiempo que se mejora la sensibilidad de la detección.

Entre las aplicaciones de los electrodos modificados con pPPA (Tabla 4) destacan las dedicadas a la preparación de inmunosensores. En una primera configuración se utilizó IgG como analito modelo, desarrollándose un inmunosensor por inmovilización covalente de anti-IgG sobre el electrodo pPPA/GCE. La determinación de la inmunoglobulina se realizó mediante el establecimiento de un esquema de tipo sandwich, con un anticuerpo secundario y otro marcado con fosfatasa alcalina, empleando p-aminofenilfosfato como sustrato [Dong, 2006]. Un diseño similar se ha utilizado más recientemente para la determinación del antígeno de la hepatitis B, si

bien modificando previamente el electrodo con nanotubos de carbono para mejorar la respuesta voltamperométrica [Hu, 2011]. También se ha descrito un inmunosensor para la hormona leptina utilizando un polímero híbrido formado por co-electropolimerización de pirrol y ácido pirrol propiónico en presencia de nanopartículas de oro. En este caso, se emplea proteína G unida covalentemente al polímero para inmovilizar el anticuerpo anti-leptina, desarrollándose así un diseño impedimétrico sin marcador [Chen, 2010]. De forma similar, la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica fue usada para poner a punto un inmunosensor para la determinación de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), utilizando en este caso electrodos serigrafados de carbono [Truong, 2011].

Con respecto a los biosensores enzimáticos, en la bibliografía consultada se han encontrado únicamente dos configuraciones. En una de ellas se inmovilizó hemoglobina sobre un electrodo de carbono vitrificado modificado con pPPA, observándose la respuesta electroquímica directa de la proteína pseudoperoxidasa, lo que hizo posible preparar un biosensor enzimático de tercera generación para la determinación de peróxido de hidrógeno [Lu, 2008]. Finalmente, otra configuración algo más compleja, basada en la inmovilización de glucosa oxidasa, se empleó para la construcción de un biosensor de glucosa. En este caso se incorporaron también nanopartículas de oro que aumentan la estabilidad de la enzima [Şenel, 2012].

Tabla 4.- Biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con pPPA.

Electrodo	Técnica	Características analíticas	Analito / Muestra	Ref.
AP-anti-IgG-IgG-anti-IgG-pPPA / GCE	DPV	I.D. hasta 10 ³ ng/mL LOD, 20 pg/mL	IgG	Dong, 2006
Hb / pPPA / GCE	Amp. -0.4 V	I.L. 0.22-35.2 μM LOD, 0.22 μM	H ₂ O ₂	Lu, 2008
anti-leptina-prot G-pPPA / pPyAuNPs / GCE	EIS	I.L. 10-10.000 ng/mL LOD, 10 ng/mL	leptina / suero	Chen, 2010
AP-anti-IgG-anti-HBsAg-HBsAg-anti-HBsAg-pPPA/CNTs/GCE	DPV	I.D.0.001-1000 ng/mL LOD, 0.01 ng/mL	HBsAg / suero	Hu, 2011
anti-hCG-pPPA-Py / SPCE	EIS	I.L. 100 pg/mL-1 ng/mL LOD, 2.3 pg/mL	hCG	Truong, 2011
GOx / pPPA / AuNPs / GCE	Amp. 0.6 V	I.L. 1 - 18 mM LOD, 0.05 mM	glucosa / plasma	Şenel, 2012

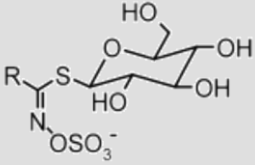
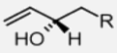

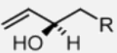

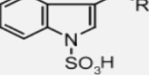
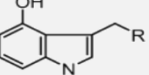
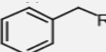
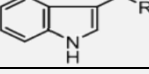
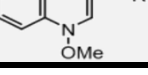
CLAVE: Hb, hemoglobina; HBsAg, antígeno de la hepatitis B; hCG, gonadotropina coriónica humana; EIS, espectroscopia de impedancia electroquímica.

3.2.3. Importancia biológica y métodos de determinación de los analitos considerados

3.2.3.1. Glucosinolatos

Es sabido que el consumo de frutas y verduras tiene una gran importancia para el mantenimiento de la salud. Entre los efectos beneficiosos de estos alimentos se ha destacado la acción biológica de muchos componentes no nutrientes y de sus metabolitos [Milner, 1999]. Los glucosinolatos, presentes en las plantas del género *Brassica* y en la familia de las crucíferas, son un ejemplo. Estos compuestos, β -tioglucosido-*N*-hidroxisulfatos, representan un grupo específico de productos naturales que se encuentran mayoritariamente en las raíces, hojas, tallos y semillas de brécol, coles de Bruselas, repollo, coliflor, rábano o mostaza, entre otras (ver Tabla 5).

Tabla 5.- Estructuras y denominación común de algunos glucosinolatos

Glucosinolato	Estructura de R	Nombre común
		epiprogoitrina
		sigrín o sigrina
		progoitrina
		gluconapina
		sulfoglucobrasicina
		4-hidroxi-glucobrasicina
		glucotropeolina
		glucobrasicina
		neoglucobrasicina

La hidrólisis de los glucosinolatos por la enzima mirosinasa (β -tioglucosidasa) proporciona glucosa, isotiocianato, nitrilos y sulfato, entre otros derivados [Heany, 1984]. Estas especies son las responsables de los sabores y aromas de estos vegetales y tienen gran importancia nutricional y comercial [Shankaranarayana, 1982]. Además, poseen propiedades fungicidas, bactericidas, nematocidas y alelopáticas. Por ejemplo, es conocida la actividad de los isotiocianatos frente a diversos patógenos humanos como la *Escherichia coli*, la *Salmonella typhimurium* y la *Candida spp.*, de donde provienen las propiedades medicinales atribuidas a estas plantas que han sido aprovechadas desde antiguo, especialmente en el caso de la mostaza [Manici, 1997; Mari, 1996]. En la Figura 4 se ha representado un esquema de la hidrólisis de los glucosinolatos.

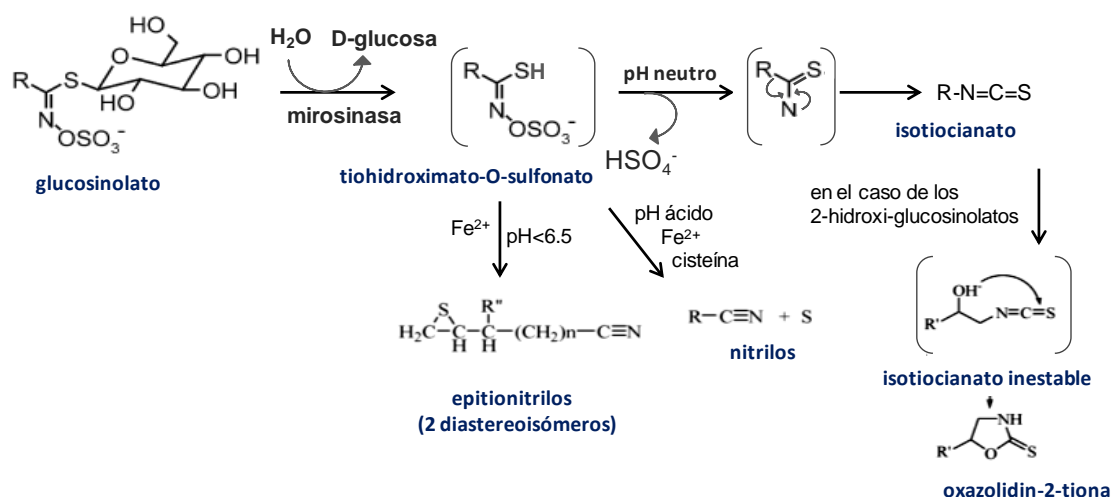


Figura 4.- Esquema de la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos [Tripathi, 2007].

Se ha atribuido a los glucosinolatos o, más concretamente, a sus productos de hidrólisis, una cierta actividad en relación a la prevención del cáncer [Fahey, 1997]. Por ejemplo, se ha comunicado [Nijhoff, 1995] que el consumo de coles de Bruselas cocinadas daba lugar a una disminución del cáncer colorrectal y a un incremento de la síntesis de la enzima detoxificante glutatión S-transferasa. También se ha descrito la acción de los productos de degradación de los glucosinolatos como agentes bloqueantes de la carcinogénesis en células hepa1c1c7 de roedores [Tawfiq, 1995]. Los isotiocianatos indol-3-carbinol, producido por la hidrólisis de glucobrasicina, y feniletilisotiocianato, de la gluconasturtina, han demostrado capacidad

reguladora de la síntesis de enzimas hepáticas destoxicantes [Bradfield, 1984; Guo, 1992; Zhang, 1992] así como actividad protectora frente a la carcinogénesis [Morse, 1989; Wattenberg, 1978; Zhang, 1994]. Finalmente, el isotiocianato derivado de la glucorafanina, glucosinolato predominante en el brécol, ha demostrado también cierta capacidad de protección frente al cáncer [Rochfort, 2006]. El estudio de su mecanismo de acción ha demostrado que la actividad quimiopreventiva de los isotiocianatos se debe a la modificación favorable del metabolismo carcinógeno de las fases I y II, que resulta en el aumento de la excreción de los carcinógenos o desintoxicación y la disminución de las interacciones carcinógenos-ADN. Por un lado, interfieren favorablemente en las enzimas de la fase I (monooxigenasas dependientes de citocromo P-450) y, por otro, inducen la actividad de las enzimas de la fase II (glutatión transferasas, NAD(P)H, quinona oxidoreductasa, UDP-glucuronosil transferasas), que convierten los agentes cancerígenos en productos fácilmente excretables [Wattenberg, 1977; Stoner, 1991; Zhang, 1992; Zhang, 1994; Jiao, 1994].

Además de estos efectos beneficiosos, es importante señalar que también se han atribuido propiedades antinutricionales o goitrogénicas, es decir, inhibidoras de la función tiroidea, a los productos de la hidrólisis de los glucosinolatos [Wallig, 2002; Tripathi, 2001]. Estas propiedades han sido estudiadas en poblaciones de animales, principalmente ganado alimentado con productos vegetales conteniendo una alta concentración de glucosinolatos, como es el caso de la harina de colza. Los estudios realizados llevaron a la Unión Europea a fijar el contenido máximo de estos compuestos en 20 $\mu\text{mol/g}$ en las formulaciones de alimentos para el ganado [Official Journal of the European Community, No. L210/55; Community Regulation No. 2435/86, July 29, 1986], así como a recomendar la producción de piensos con muy baja cantidad de glucosinolatos, preparados a base de canola.

Aunque los glucosinolatos están presentes en las plantas de forma aislada físicamente de la enzima mirosinasa, sin embargo, la ruptura de los tejidos en su procesado o en la ingestión facilita el contacto entre ambas, lo que da lugar a la hidrólisis de los glucosinolatos. Dicha hidrólisis también tiene lugar por acción de la mirosinasa producida por la microflora intestinal [Bernardi, 2003]. Una vez formados, los derivados de los glucosinolatos pueden ejercer acciones perjudiciales para la salud. Se sabe que los nitrilos pueden afectar las funciones

hepática y renal, mientras que los tiocianatos interfieren con la disponibilidad de yodo en el tiroides y, junto a los isotiocianatos y las oxazolidin-2-tionas, ralentizan la función tiroidea disminuyendo la formación de tiroxina [Tripathi, 2007].

-Métodos de determinación de glucosinolatos

Dada la importancia de estos compuestos y de sus derivados, se han descrito numerosos métodos para su determinación basados principalmente en técnicas cromatográficas. Su aplicación a muestras reales requiere una etapa previa de tratamiento de muestra que, por lo general, consiste en la extracción de los glucosinolatos de las partes de los vegetales de interés o de sus semillas empleando disolventes a alta temperatura, con el fin de desactivar la mirosinasa endógena previniendo así la degradación por hidrólisis enzimática. Como extractante, algunos métodos utilizan simplemente agua [Guo, 2005; Kushad, 1999; Szmigielska, 2000] o mezclas de metanol y agua [Kiddle, 2001; Verkerk, 2001; Bennett, 2007]. Para prevenir la degradación enzimática por la mirosinasa, el material a ser extraído se trata primero a 100 °C [Mellon, 2002; Botting, 2002; Song, 2004; Bennett, 2004] o se realiza directamente la extracción a alta temperatura, típicamente 70–100 °C [Guo, 2005; Kushad, 1999; Szmigielska, 2000; Kiddle, 2001; Verkerk, 2001; Bennett, 2007].

Para la limpieza de las muestras se ha utilizado extracción en fase sólida, usando, por ejemplo, cartuchos C18 [Botting, 2002], así como columnas de intercambio iónico [Thies, 1997] o membranas intercambiadoras [Szmigielska, 2000]. Algunos métodos aplican un tratamiento previo de desulfación enzimática, por adsorción de los glucosinolatos extraídos en un soporte tipo Sephadex A-25. Una vez tratados, los desulfoderivados pueden separarse mediante HPLC en fase inversa [EEC Regulation No. 1864/90, Off. J. Eur. Communities L170 (1990) 27]. También se han propuesto métodos para la separación directa de glucosinolatos sin necesidad de este tedioso tratamiento de muestra, empleando, por ejemplo, reactivos para la formación de pares iónicos como bromuro de tetraalquilamonio [Frechard, 2001; Prestera, 1996], acetato amónico [Kokkonen, 1991] o mezclas reguladoras trietilamina/ácido fórmico [Zrybko, 1997], en

combinación con el uso de columnas RP-18. Sin embargo, estos métodos tienen el problema de la aparición de colas y en algunos casos, la separación es incompleta.

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo a la búsqueda de métodos de aislamiento y purificación de glucosinolatos individuales y sus derivados. Por ejemplo, para la determinación del glucosinolato glucorafanina en brécol, se aplicó la técnica de cromatografía micelar electrocinética (MEKC) empleando colato sódico como fase micelar. Las muestras se tratan con agua hirviendo durante 5 minutos antes de la separación, obteniéndose un límite de detección de 4 mg por 100 g de semillas [Lee, 2010]. En otro método se usó extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía micelar electrocinética capilar (MECC). La extracción se realiza en agua hirviendo y las impurezas se retienen sobre cartuchos C18 y aminopropil conectados en serie. Después se eluye el glucosinolato con una disolución de amoníaco al 2% en metanol. El disolvente se evapora y se disuelve el residuo en agua. La separación se realiza con una mezcla de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, NaH_2PO_4 y bromuro de cetiltrimetilamonio [Trenerry, 2006].

Como ejemplos de los métodos más recientes, puede citarse, en primer lugar, el desarrollado para el sulforafeno, isotiocianato derivado de la glucorafanina con actividad farmacológica importante, en el que se realiza su separación y purificación a partir de semillas de rábano, mediante cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC). Primero se promovió la hidrólisis espontánea de los glucosinolatos por medio de la mirosinasa endógena, manteniendo los trozos de vegetal a 25°C durante 25 min en regulador fosfato de pH 7.0. Después, la separación se realizó empleando un disolvente en dos fases: n-hexano-acetato de etilo-metanol-agua (35:100:35:100, v/v/v/v) [Kuang, 2013]. En otro método, se describió un procedimiento de derivatización de isotiocianatos a derivados estables metil ester N-(tertbutoxicarbonil)-L-cisteína, que pueden separarse por HPLC en gradiente previa extracción con acetato de etilo, empleando mezclas de regulador dihidrógeno fosfato / ácido fosfórico - acetonitrilo - agua. Este método es también aplicable a la determinación indirecta de glucosinolatos tras su hidrólisis con mirosinasa. El procedimiento se aplicó a la determinación simultánea de glucorafanina y sulforafeno en muestras de orina, plasma y heces [Budnowski, 2013].

La determinación de los glucosinolatos sinigrín y sinalbín, y sus productos de hidrólisis, alilisotiocianato y bencilisotiocianato, presentes en extractos de mostaza, se realizó mediante HPLC en fase inversa previa extracción en autoclave, con agua a temperatura de ebullición. Los límites de detección para los glucosinolatos fueron de 0.05 mg/L. Se utilizó la misma fase móvil para ambos tipos de compuestos: hidrógenosulfato de tetrabutilamonio y acetonitrilo, encontrándose 4.06 g de sinigrín por 100 g de muestra [Herzallah, 2012]. Finalmente, el método más reciente encontrado en la bibliografía para la determinación de glucosinolatos recomienda el empleo de cromatografía líquida acoplada a un detector de series de diodos (DAD) y un espectrómetro de masas (ESI-MS). La mirosinasa se desactiva usando agua y calentamiento en microondas. Los límites de detección para 12 glucosinolatos en hojas de brécol oscilaron entre 10 y 72 µg/g con DAD y entre 0.01 y 0.23 µg/g with ESI-MS [Ares, 2014].

Como se ha visto, el número de métodos cromatográficos para la determinación de glucosinolatos y sus derivados es elevado. Sin embargo, en la bibliografía prácticamente no aparecen métodos enzimáticos ni mucho menos biosensores para estos compuestos. Dado que el método desarrollado en este trabajo se basa en el diseño de un biosensor, en la Tabla 6 se han resumido las características de los escasos procedimientos encontrados que guardan alguna semejanza con el propuesto.

Tabla 6.- Métodos enzimáticos para la determinación de glucosinolatos

Método	Características analíticas	Analito / muestra	Ref.
Inmov. de MYR en membrana de nylon. Ensayo cinético-enzimático basado en el método de la velocidad inicial	IL: hasta 3.5 μ mol	Sinigrín / extracto de colza	Leoni, 1991
Sinigrín: hidrólisis a pH 7 (30°C,15min) con mirosinasa. Detección amperom. sobre electrodo de O ₂ con GOx + CAT sobre membrana. Isotiocianato: conversión a alitiourea y detección sobre electrodo de O ₂ por inhibición oxid. catecol con TYR sobre membrana.	IL: hasta 0.9 mM (glucosa)	Sinigrín y su isotiocianato / semillas de colza	Stançik, 1995
Sistema enzimático de flujo con MYR inmov. sobre vidrio de poro controlado empaq. en reactor y GOx en célula multimembrana. Detección amperom. de H ₂ O ₂ sobre electrodo de Pt. Determinación por diferencia respecto de la concentración de glucosa en ausencia de MYR.	IL: 0.005 – 1.0 mM (sinigrín);	Glucosinolatos / hojas y semillas	Tsiafoulis, 2003
Sistema enzimático de flujo con MYR y GOx inmov. sobre membranas de cáscara de huevo. Detección fluorim. con un sensor sensible al O ₂ .	ID (no lineal): hasta 2.0 mM (glucosa)	Glucosinolatos / vegetales	Choi, 2005
Biosensor bienzimático de MYR y GOx inmov. sobre una membrana de cáscara de huevo. Detección amperom. sobre un electrodo de O ₂ . Determinación por diferencia respecto de la concentración de glucosa con un biosensor de GOx.	IL: (2.5 – 75) 10 ⁻⁵ M (Sinigrín)	Glucosinolatos / semillas	Wu, 2005

Según se aprecia en dicha tabla, los esquemas de determinación enzimática y los biosensores descritos en la bibliografía se basan en el empleo de la enzima mirosinasa. Ya se ha indicado que esta enzima, una glucósido hidrolasa, cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos, siendo la única existente en la naturaleza capaz de romper los enlaces tio-glucosa [Bones, 2006]. Tanto la enzima como su sustrato natural forman parte del sistema de defensa de algunas plantas frente al ataque por patógenos, insectos y animales herbívoros, de tal forma que al sufrir algún daño, la mirosinasa presente en el vegetal transforma los glucosinolatos en productos con cierta toxicidad para estos animales como los ya citados: isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos. En esta reacción catalítica, el ascorbato actúa como cofactor de la mirosinasa, mientras que el sulfato, un subproducto de la hidrólisis, ha sido identificado como inhibidor.

La enzima mirosinasa existe en forma de dímero, con subunidades de 60-70 kDa unidas por un átomo de cinc (Figura 5) [Burmeister, 2000]. La presencia de puentes disulfuro y de enlaces de hidrógeno, entre otros factores, contribuye a estabilizar la enzima.

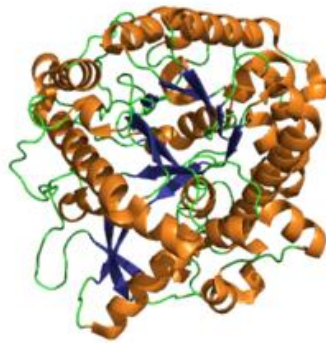


Figura 5.- Enzima mirosinasa (tioglucosidasa)

Entre los métodos más recientes recogidos en la Tabla 6, cabe destacar el basado en el empleo de un biosensor amperométrico para la determinación de glucosinolatos en semillas, en el que las enzimas MYR y GOx se inmovilizan sobre una membrana de cáscara de huevo en presencia de glutaraldehído como agente entrecruzante [Wu, 2005]. Una vez colocada sobre un electrodo de oxígeno, este se introduce en una disolución de regulador fosfato de pH 6.0 y se establece un calibrado empleando sinigrín como glucosinolato plantilla. La muestra se trata a 120 °C durante 10 min y luego se pulveriza, agitando después en regulador fosfato de pH 6.0. La

determinación se realiza por diferencia del contenido de glucosa total (con el biosensor bienzimático) y de glucosa libre (con el mismo biosensor en ausencia de MYR). Este mismo tipo de membrana se utilizó para desarrollar un sistema enzimático en flujo con MYR inmovilizada, determinando la glucosa producida con un biosensor de GOx inmovilizada sobre un optodo de membrana sensible al oxígeno dispuesto en una célula de flujo. El método se aplicó a muestras de vegetales hervidos en agua 5 min para desactivar la mirosinasa endógena. Una vez centrifugada, la disolución se trata con diferentes reactivos de limpieza y finalmente se pone en contacto con la mirosinasa inmovilizada en medio regulador fosfato de pH 6.5 durante 16 h a 37 °C, determinándose la glucosa generada sobre el biosensor óptico [Choi, 2005]. En otro método enzimático en continuo, se empleó un reactor de vidrio de poro controlado empaquetado y activado con glutaraldehido para inmovilizar la enzima MYR, mientras que la GOx se inmovilizaba sobre una membrana de nylon carboxilada tratada con carbodiimida, dispuesta sobre un electrodo de platino con una membrana adicional de acetato de celulosa para evitar las interferencias de otras especies electroactivas. Sobre este electrodo se detecta el peróxido de hidrógeno a un potencial de +0.65 V vs Ag/AgCl. El analizador de flujo puede usarse en dos posiciones para determinar la glucosa libre y la glucosa generada en la hidrólisis de la muestra [Tsiafoulis, 2003].

3.2.3.2. Creatinina

La medida de los niveles de creatinina en suero humano u orina es esencial desde el punto de vista clínico, ya que estos reflejan el estado de la función renal y muscular. La creatinina (ver fórmula en la Figura 6a) se produce de forma natural en el organismo, como un compuesto de degradación de la creatina (Figura 6b), un nutriente de los músculos, y se filtra a través de los riñones excretándose en la orina.

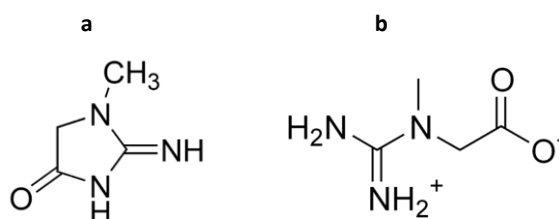


Figura 6.- Fórmulas de la creatinina (a) y la creatina (b)

La concentración fisiológica normal de creatinina en sangre está comprendida entre 40 y 150 $\mu\text{mol/L}$, pero puede exceder de 1000 $\mu\text{mol/L}$ bajo ciertas condiciones patológicas. Niveles superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ indican la existencia de una enfermedad renal severa, que requeriría realizar un tratamiento de diálisis o el trasplante de riñón. Por otro lado, concentraciones inferiores a 40 $\mu\text{mol/L}$ ponen en evidencia una disminución de la masa muscular [Lad, 2008].

La forma tradicional de determinación de creatinina es la basada en un ensayo colorimétrico empleando la reacción de Jaffé. En ella se utiliza picrato sódico en medio alcalino, que forma un complejo de color amarillo-rojizo [Jaffé, 1880]. También se han empleado métodos enzimáticos para la obtención de productos coloreados [Siedel, 1984]. Sin embargo, estos métodos están sujetos a diversas interferencias, por ejemplo debidas a la presencia de ion amonio [Weber, 1991].

El número de biosensores descritos en la bibliografía para la determinación de creatinina es muy elevado, habiendo sido objeto de diversas revisiones [Killard, 2000; Lad, 2008; Mohabbati-Kalejahi, 2012]. Hay que decir que el uso de estos dispositivos en los laboratorios

de análisis clínicos ha reducido costes, tiempo de análisis, complejidad de los análisis de rutina, y ha hecho posible la aplicación a todo tipo de muestras, como sangre, orina y saliva, tanto en centros y consultas médicas como, más recientemente, directamente en el hogar de los pacientes.

En este resumen de antecedentes, se van a considerar exclusivamente los diseños basados en el empleo de transductores electroquímicos, que son los predominantes. Entre ellos, se han descrito diversas aplicaciones de biosensores potenciométricos basados generalmente en sensores de amoníaco [Meyerhoff, 1976] o en electrodos selectivos de ion amonio [Radomska, 2004]. Por otro lado, existe una variedad de biosensores amperométricos que emplean electrodos modificados con materiales diversos. Dentro de este grupo se encuentra el primer sistema comercializado con éxito para la determinación de creatinina, el biosensor de Nova Biomedical, Rodermark, Germany. Además, la empresa Abbott Inc. incluyó también uno de estos sistemas para la detección de este compuesto en sus “i-STAT point-of-care devices”.

En la Tabla 7 se han recogido, a modo de ejemplo, algunos diseños relevantes de biosensores amperométricos. Como puede observarse, la práctica totalidad de las metodologías utilizadas hacen uso de las enzimas creatininasa (creatinina amidohidrolasa, CA), creatinasa (creatina amidinohidrolasa, CI) y sarcosina oxidasa, (SO), con la subsecuente detección de peróxido de hidrógeno. La secuencia de reacciones que tiene lugar se ha representado en la Figura 7.

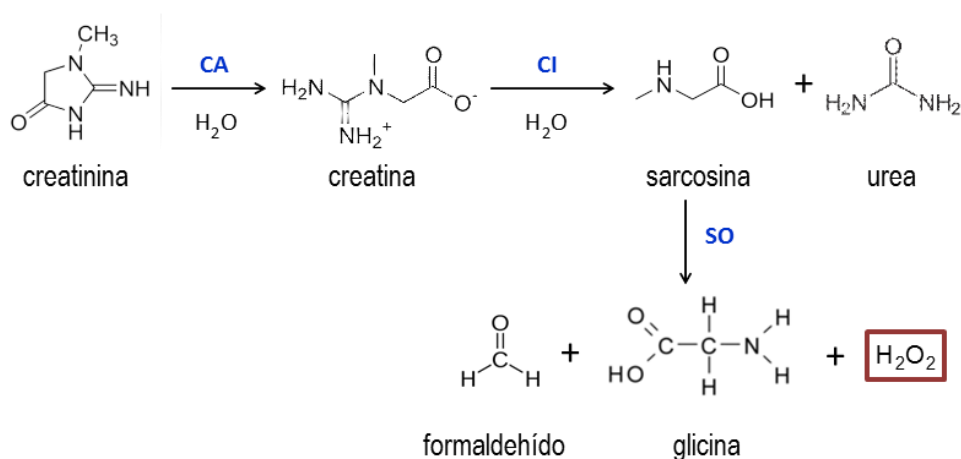


Figura 7.- Secuencia de reacciones enzimáticas producidas a partir de la creatinina en presencia de creatininasa (CA), creatinasa (CI) y sarcosina oxidasa (SO).

Tabla 7.- Biosensores amperométricos para la determinación de creatinina

Método	Características analíticas	Muestra	Ref.
Electrodeposición de negro de Pt sobre película flexible de polipirrol. Adsorción de las enzimas CA, CI y SA, secado, adición de una capa de gelatina y entrecruzamiento con GA. Det. +0.4 V vs Ag/AgCl.	I.L. 0.2 - 2 mM; LOD: 1-2 μ M	-	Khan, 1997
Electrodo de película fina de carbono con un 10% de polvo de carbono tratado con plasma de oxígeno y con las enzimas CA, CI y SA sobre una superficie de plástico. Det. + 0.5 V vs Ag/AgCl.	I.L.: hasta 5 mM; $K_M^{app} = 5.15$ mM.	-	Kim, 1999
Entrecruzamiento de creatinina desaminasa sobre electrodo de carbono vitrificado modificado con nafión y polianilina electrodepositada. Det. en flujo del ion amonio formado, -0.2 V vs Ag/AgCl	I.L. 0.5 - 500 μ M; LOD: 0.5 μ M;	Orina	Shih, 1999
Preparación de microbiosensor serigrafiado de Pt, Ag y pastas dieléctricas en una superficie de Al ₂ O ₃ . Incorporación de CA, CI, SO y PVA. Preparación de membrana protectora de poliuretano hidrofílico. Adición de una capa oxidante de PbO ₂ para evitar interferencias. Det. +0.8 V.	I.L. 1 - 1000 μ M; LOD: 0.8 μ M	Suero	Shin, 2001
Inmovilización de CA, CI y SO sobre un PtE con ayuda de una matriz de hidrogel de poli(carbamoil-sulfonato) y una película de nafión. Det.+0.6 V vs Ag/AgCl	I.L. 0.06 - 1.7 mg/ dL	Suero	Tombach, 2001
Inmovilización de CA, CI y SO en un hidrogel de poli(carbamoil-sulfonato) sobre un electrodo de platino serigrafiado modificado con nafión. Detección amperométrica en flujo a +0.6V vs Ag/AgCl	I.L. 10 - 1000 μ M	Dializado	Erlenkötter, 2002
Inmovilización de CA, CI y SO sobre un PtE con BSA / GA. Det. +0.7 V vs Ag/AgCl (continuo)	I.L. hasta 500 μ M; LOD: 4.5 μ M	Orina Suero	Walsh, 2002
Inmovilización covalente de CA, CI y SO en una membrana de polipropileno modificada con ácido poliacrílico sobre un electrodo de plata/platino.	I.L. 3.2 - 320 μ M	-	Hsiue, 2004
Inmovilización covalente de CA, CI y SO vía EDC/NHS sobre MWCNTs/PANI electrodepositado sobre un electrodo de platino. Detección amperométrica a +0.2 V vs Ag/AgCl	I.L. 10 - 750 μ M; LOD: 0.1 μ M; $K_M^{app} = 0.26$ mM	Suero	Yadav, 2011
Inmovilización de CA, CI y SO sobre un electrodo ZnONPs/ Chit/ c-MWCNTs/PANI/PtE preparado electroquímicamente. Det. + 0.5 V vs Ag/AgCl	I.L. 10 - 650 μ M; LOD: 0.5 μ M; $K_M^{app} = 0.35$ mM.	Suero	Yadav, 2011a
Inmovilización de CA, CI y SO sobre Fe ₃ O ₄ NPs/Chit-g-PANI/PtE con GA. Det. + 0.4 V vs Ag/AgCl.	I.L. 1 - 800 μ M; LOD: 1 μ M; $K_M^{app} = 0.17$ mM	Suero	Yadav, 2012
Inmovilización de CA, CI, SO y HRP, y del mediador redox penta-cianoferrato-poli(1-vinilimidazol) sobre GCE por entrecruzamiento con poli(etilenglicol)diglicidil éter + nafión. Det. -0.1 V vs Ag/AgCl	I.L. 12 - 500 μ M LOD: 12 μ M	Orina	Nieh, 2013

CLAVE: PVA, poli(vinil alcohol); BSA, albúmina de suero bovino; EDC, N-(3-dimetilaminopropil)- N'-etilcarbodiimida; NHS, N-hidroxisuccinimida; GA, Glutaraldehído; PANI, polianilina; Fe₃O₄NPs, nanopartículas de óxidos ferroso y férrico; Chit, quitosán; HRP, peroxidasa

La alternativa multienzimática fue propuesta por Tsuchida [Tsuchida, 1983] e investigada en profundidad por Sakslund [Sakslund, 1992]. Para su implementación, se han desarrollado numerosas alternativas utilizando diferentes sistemas de inmovilización de las enzimas, así como de mediadores redox para mejorar la selectividad de la detección. Como puede verse en la Tabla 7, en los diseños más antiguos se emplearon electrodos de negro de platino depositado sobre una película polimérica [Khan, 1997], y electrodos de película de carbono [Kim, 1999]. La necesidad de utilizar tres enzimas en este tipo de diseños confiere una relativa complejidad a la preparación de las superficies electródicas. La estrategia de inmovilización es, por ello, la parte más importante de la construcción de estos biosensores, y se optimiza buscando las mejores características analíticas y la mayor estabilidad operacional y de almacenamiento [Killard, 2000]. Como aparece en la Tabla, entre las metodologías de inmovilización empleadas destacan las que emplean películas protectoras, con el inconveniente de causar una disminución de la sensibilidad y una ralentización de la respuesta. Por ejemplo, se han utilizado hidrogeles [Tombach, 2001], agentes de entrecruzamiento [Walsh, 2002] y membranas [Shin, 2001; Hsiue, 2004]; [Erlenkötter, 2002]. Estas alternativas también cumplen el objetivo de mejorar la selectividad, eliminando interferencias. El ejemplo más representativo en este caso es el naftión, capaz de evitar las respuestas electroquímicas de especies como el ascorbato o el urato presentes en las muestras de suero u orina.

Con el fin de mejorar la detección, otras configuraciones más recientes emplean nanomateriales como nanotubos de carbono [Yadav, 2011] y nanopartículas de óxidos o polímeros [Yadav, 2011a; Yadav 2012]. Con ellas se logra una buena estabilidad de las biomoléculas al tiempo que una mayor sensibilidad y alta selectividad. Actualmente se siguen desarrollando biosensores amperométricos para creatinina que incorporan mediadores redox capaces de lograr una considerable disminución del potencial de medida, lo que los hace idóneos para su empleo en el análisis de muestras complejas [Nieh, 2013].

En la Tabla 8 se presentan también las características analíticas de algunos sistemas comerciales para la determinación de creatinina disponibles en forma de "kits".

Tabla 8.- Sistemas ("kits") comerciales para la determinación de creatinina

Sistema	Método	Características analíticas	Muestra
Cayman assay kit 700460	Formación de complejo con ácido pícrico. Detección colorimétrica	I.L.: hasta 5 mg/dL LOD: 0.1 mg/dL. Precisión: 6.4% (intra); 4.6% (inter). Tiempo de ensayo, 8 min	Suero
Oxford Biomed.		I.L.: hasta 0.1mg/mL	Orina
Cell Biolabs		I.L.: hasta 0.2mg/mL Tiempo de ensayo, 30 min	Orina
BioAssay Systems, DICT 500		I.L.: hasta 0.5 mg/mL Tiempo de ensayo, 5 min	Orina, suero y plasma
R&D systems		I.L.: 0.31µg/mL - 0.1 mg/mL	Orina
Enzo ADI - 907 030A		I.L.: 0.31µg/mL - 0.2 mg/mL	Orina
Arbor Assays		I.L.: 0.31µg/mL - 0.2 mg/mL	Orina
Abcam, ab65340	Detección colorimétrica o fluorimétrica de H ₂ O ₂ generado por reacción enzimática en presencia de CA, CI y SO	I.L.: hasta 22.6 µg/mL (colorim.) hasta 1.8 µg/mL (fluorim)	Plasma y suero
BioVision K625-100		I.L.: hasta 22.6 µg/mL (colorim); hasta 1.8 µg/mL (fluorim)	Orina
Sigma Assay Kit MAK080		I.L.: hasta 2.26 µg/mL. Tiempo de ensayo, 60 min	Téjido, células y suero

Como puede verse, existen dos tipos principales, los basados en la detección colorimétrica del complejo con ácido pícrico (método de Jaffé), y los que hacen uso de la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), empleando las enzimas CA, CI y SO, con detección espectrofotométrica o fluorimétrica del peróxido de hidrógeno generado. Aunque los protocolos de trabajo de dichos sistemas no proporcionan todos los datos analíticos que se contemplan en la tabla, puede decirse, en general, que los primeros presentan intervalos dinámicos extendidos a concentraciones de creatinina algo más elevadas, así como tiempos de análisis más breves, mientras que los basados en la técnica de inmunoensayo permiten detectar concentraciones menores, aunque el tiempo de análisis puede ser algo mayor.

3.2.3.3. Etanol

La determinación de etanol tiene una gran importancia tanto desde el punto de vista clínico como tecnológico, principalmente en el área de la producción de alimentos. El número de biosensores electroquímicos desarrollado en los últimos años para llevar a cabo esta determinación ha sido enorme, habiéndose revisado este tema en diversas publicaciones [Azevedo, 2005; Yáñez-Sedeño, 2014]. En estas configuraciones se utiliza la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en presencia del cofactor NAD⁺, o bien la enzima alcohol oxidasa (AlcOx). Esta última alternativa es más simple, ya que únicamente se requiere oxígeno para que se produzca la oxidación del etanol a acetaldehído y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, uno de los principales problemas de este esquema es la escasa estabilidad de la enzima.

En la Tabla 9 se han resumido las características analíticas de algunas configuraciones relevantes de biosensores electroquímicos para etanol descritas en los últimos años. Se han seleccionado los diseños basados en estrategias de modificación electródica similares a la empleada en este trabajo, es decir, en la inmovilización no covalente de la enzima ADH sobre electrodos modificados con nanomateriales y/o polímeros conductores.

Tabla 9.- Características analíticas de algunos biosensores electroquímicos de ADH para la determinación de etanol basados en la inmovilización no covalente de la enzima.

Electrodo	Método	E_{det} , V	Intervalo lineal, mM	Pendiente, $\mu\text{A}/\text{mM}$	LOD, μM	Muestra	K_M^{ap} , mM	Ref.
SNMB / CPE	Preparación de gel de sílice modificada con NbO y MB (SNMB). Preparación de un CPE con grafito, ADH, BSA, GA, SNMB, NAD^+ y aceite mineral.	0.0 vs SCE	0-1 - 10	-	8	bebidas	-	Santos, 2003
MWCNT / MB pasta	Adsorción de ADH sobre MWCNT/MB y entrecruzam. con GA	0 vs SCE	0.05 -10	0.60	5	bebidas	-	Santos, 2006
MWCNT / TiO_2 / Nafion / GCE	Modificación de GCE con suspensión de MWCNT en sol-gel de TiO_2 y nafion. Adsorción de ADH	0.5 vs Ag/AgCl	0.01 - 3	7.2	5	-	-	Choi, 2007
pNbA / SWCNT / GCE	Electropolim. de pNbA por CV sobre SWCNT. Adsorción de la enzima y entrecruzamiento con GA	0.1 vs SCE	0.1 - 3	-	50	-	6.30	Du, 2007
PDDA / SWCNT / GCE	Modificación ("wrapping") de SWCNT con PDDA. Inmov. de ADH por interacción electrostática.	0.1 vs SCE	0.5 - 5.0	-	90	-	5	Liu, 2007
PVA / MWCNT / GCE	Preparación de PVA/MWCNT por incorporación de nanotubos a un criogel de PVA. Para el biosensor se añaden ADH y MWCNT	0.7 vs Ag/AgCl	hasta 1.5	0.196	13	bebidas	-	Tsai, 2007
CNF / GCE	Adsorción de ADH sobre GCE modificado con CNF	0.06 vs SCE	0.010 - 0.425	-	3	-	-	Wu, 2007
AuNPs / PEDOT-PSS / ITO	Preparación de PEDOT-PSS sobre ITO ("spin-coating"). Electrodep. de AuNPs por CV. Adsorción de ADH.	0.04 vs SCE	0.001 - 0.1	-	-	-	13	Manesh, 2008

CLAVE: SNMB, gel de sílice modificada con NbO y Azul Meldola; CPE, electrodo de pasta de carbono; MWCNT, nanotubos de carbono de pared múltiple; SWCNT, nanotubos de carbono de pared simple; GCE, electrodo de carbono vitrificado; pNbA, poli(azul de Nilo A); GA, glutaraldehído; Chit, quitosan; ITO, electrodo de óxido de indio y estaño; PDDA, poli(dialildimetilamonio); CNF, nanofibra de carbono

Tabla 9 (Cont.).- Características analíticas de algunos biosensores electroquímicos de ADH para la determinación de etanol basados en la inmovilización no covalente de la enzima.

Electrodo	Método	E_{det} , V	Intervalo lineal, mM	Pendiente, $\mu\text{A}/\text{mM}$	LOD, μM	Muestra	K_M^{ap} , mM	Ref.
AuNPs / MWCNT /teflon	Prep. electrodo por mezcla de AuNPs, MWCNTs y teflón. El biosensor se prepara añadiendo ADH	0.3 vs Ag/AgCl	0.02 -1.0	2.27	4.7	cerveza	4.95	Manso, 2008
MWCNT / Chit / GCE	Modificación de GCE con mezcla de MWCNT y Chit. Incorporación a la superficie del GCE. El biosensor se prepara igual mezclando MWCNT, Chi y ADH	0.7 vs Ag/AgCl	-	11.6	0.52	bebidas	0.38	Lee, 2009
PBCB / SWCNT / GCE	Modificación de GCE por adsorción de SWCNT. Electrodep. de PBCB sobre SWCNT/GCE a +0.9 V. Adsorción de ADH.	0 vs SCE	0.4 - 2.4	9.89	100	-	2.3	Yang, 2009
[C₄mpyr][NTf₂] / MWCNT / CPZ / GCE	Modif. de GCE con mezcla de MWCNT, CPZ y liq. iónico. El biosensor se prepara añadiendo ADH	DPV; $E_p = 0.1$ V vs Ag/AgCl	0.04-1.5	1.97	5	-	-	Salimi, 2010
IL-G / Chit	Preparación de IL-G por agitación de GO e IL en KOH a 80 °C 24 h y reducción con NaBH ₄ . Modif. de GCE con IL-G y Chit. Adsorción de ADH.	0.45 vs Ag/AgCl	0.025 -0.2	0.488	5	bebidas	-	Shan, 2010
[C₄mpyr][NTf₂] / MWCNT/GCE	Modificación del GCE con la mezcla de MWCNT y el líquido iónico. Adsorción de ADH. Inmovilización de NAD ⁺ mediante CV	0.1 vs Ag/AgCl	0.005 - 0.06 0.06 - 0.9	-	0.5	bebidas	-	Teymourian, 2012
rGO / PTH / GCE	Inmersión de GCE en una suspensión de GO y TH. Electrodeposición de rGO y PTH por CV. Adsorción de ADH y BSA seguido de entrecruzamiento con GA	0.4 vs SCE	0.05 - 1.0	0.19	0.3	-	-	Li, 2013

CLAVE: PBCB, poli(azul de cresilo brillante); IL, bromuro de 1-(3-aminopropil)-3-metilimidazolio; G, grafeno; rGO, óxido de grafeno reducido; PTH, politionina

Como puede verse, la mayoría de los biosensores recientes utilizan nanotubos de carbono depositados mayoritariamente sobre superficies de carbono vitrificado como plataformas electrónicas [Santos, 2006; Liu, 2007; Tsai, 2007; Du, 2007; Cgoi, 2007; Manso, 2008; Yang, 2009; Lee, 2009; Salimi, 2010; Teymourian, 2012]. Con ello se aprovechan las propiedades únicas de este material, relacionadas no solo con su elevada conductividad eléctrica, sino también con su actividad electrocatalítica hacia el proceso de oxidación del NADH, especie a monitorizar en la reacción del etanol en presencia de ADH y NAD⁺. El efecto electrocatalítico hace posible detectar la respuesta electroquímica a un potencial menos positivo que sobre los electrodos convencionales. La incorporación de otros materiales utilizados frecuentemente como mediadores redox, tal como es el caso del Azul Meldola [Santos, 2006], el Azul de Nilo A [Du, 2007], o el Azul de cresilo brillante [Yang, 2009], polimerizados o no sobre la superficie electrónica, contribuye a acentuar el efecto de desplazamiento del potencial, pudiéndose monitorizar la señal de oxidación del NADH a valores tan bajos como 0 v vs SCE [Santos, 2006; Yang, 2009]. En estas configuraciones, la enzima se adsorbe sobre la superficie modificada, procediéndose en algunos casos a mejorar su estabilidad por entrecruzamiento con glutaraldehído.

Además de los mediadores redox, otros diseños de biosensores para etanol combinan los nanotubos de carbono con líquidos iónicos [Salimi, 2010; Teymourian, 2012], quitosan [Lee, 2009] o polielectrólitos como el PDDA [Liu, 2007]. Estos materiales poseen diferentes propiedades, aunque en común exhiben una excelente capacidad de dispersión de los nanotubos de carbono. En particular, los líquidos iónicos se caracterizan por su alta conductividad, participando sinérgicamente en el efecto electrocatalítico ejercido por el nanomaterial. El polisacárido quitosán contiene un elevado número de grupos hidroxilo que facilitan la adsorción de la biomolécula y, finalmente, el PDDA cargado positivamente, hace posible la inmovilización de la enzima ADH por atracción electrostática trabajando en un medio de pH superior a su punto isoeléctrico (6.8) [Dalziel, 1966]. Los líquidos iónicos y el quitosán se han empleado también, más recientemente, para preparar biosensores de similares características basados en grafeno u óxido de grafeno reducido [Shan, 2010; Li, 2013].

Según se observa en la tabla, el uso de nanopartículas de oro (AuNPs) para la preparación de biosensores de ADH es relativamente escaso. En una configuración desarrollada en 2008 por nuestro grupo, se fabricó un electrodo de pasta con AuNPs, nanotubos de carbono y teflón como agente aglutinante, observándose la contribución de las nanopartículas a mejorar la cinética electroquímica del proceso de oxidación del NADH así como la estabilidad de la enzima adsorbida en la configuración ADH/AuNPs/MWCNTs/teflón [Manso, 2008]. Por otro lado, estas nanopartículas se han combinado con el polímero PEDOT (poli(etilendioxitiofeno)) en un diseño más complejo, en el que se usa también poli(ácido estireno sulfónico) (PSS), todos ellos depositados sobre un electrodo ITO ópticamente transparente [Manesh, 2008]. El conjunto PEDOT-PSS forma una película fina sobre la superficie electroquímica en la que posteriormente se electrodeposita el oro, dando como resultado un material híbrido con una elevada actividad electrocatalítica. Como puede observarse en la tabla, este biosensor permite la determinación de bajas concentraciones de etanol, en el intervalo de 1 a 100 μM .

3.2.3.4. Hormona del crecimiento (hGH)

Actualmente, la determinación de hormonas tiene un gran interés, ya que estas especies participan en muchos procesos bioquímicos importantes y están relacionadas con analitos a monitorizar en el campo de los biomarcadores, para la prevención, detección, y seguimiento de enfermedades. En el caso de la hormona del crecimiento humana (hGH), el interés de su determinación es doble, ya que su concentración en el organismo, además de proporcionar valiosa información en dicho campo, también pone de manifiesto la posible existencia de dopaje en ciertas prácticas deportivas en las que se aprovecha la mejora del rendimiento físico o la resistencia al estrés que proporciona su consumo. Antes de pasar a comentar los diferentes métodos de que se dispone para la determinación de hGH se van a describir brevemente sus características.

La hormona del crecimiento humana (Figura 8) es un polipéptido sintetizado y secretado por la glándula pituitaria anterior [Popii, 2004]. La especie que circula por el organismo consiste en realidad en varias isoformas, entre las que predomina la de 22 kDa.

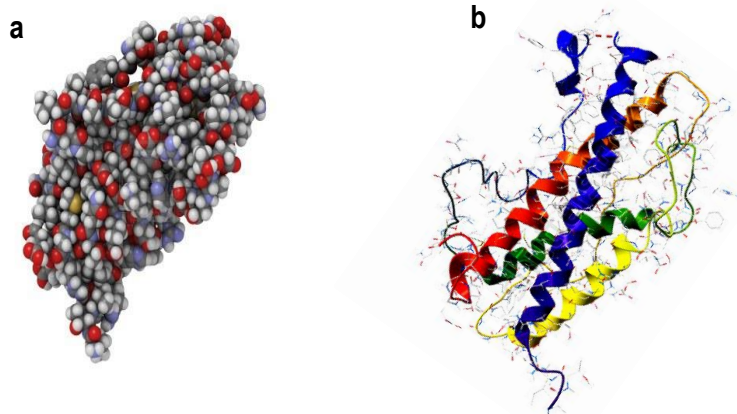


Figura 8.- Formas estructurales de la hormona del crecimiento humana. Imágenes tomadas de (a) www.czechgenealogy.org y (b) www.shutterstock.com.

Esta hormona es esencial para el crecimiento del cuerpo, ya que estimula la producción del factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) que, a su vez, promueve la formación de células del tejido cartilaginoso, lo que da lugar al desarrollo de los huesos. Al mismo tiempo, la hGH juega un papel importante en el metabolismo de las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono [Bowes, 1997].

Como puede apreciarse en la Figura 9, los principales controladores de la secreción de hGH son los péptidos liberados por los núcleos neurosecretorios del hipotálamo: la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (hGHR) y la hormona inhibidora de la hormona del crecimiento o somatostatina. La hGH formada en la hipófisis promueve en el hígado la síntesis de IGF-1. Entre sus efectos destaca la estimulación del crecimiento durante la infancia, así como el incremento en la retención de calcio y la mineralización de los huesos. También aumenta la masa muscular, promueve la gluconeogénesis en el hígado, contribuye al mantenimiento y función de los islotes pancreáticos, estimula el sistema inmune y promueve la lipólisis [Low, 1991].

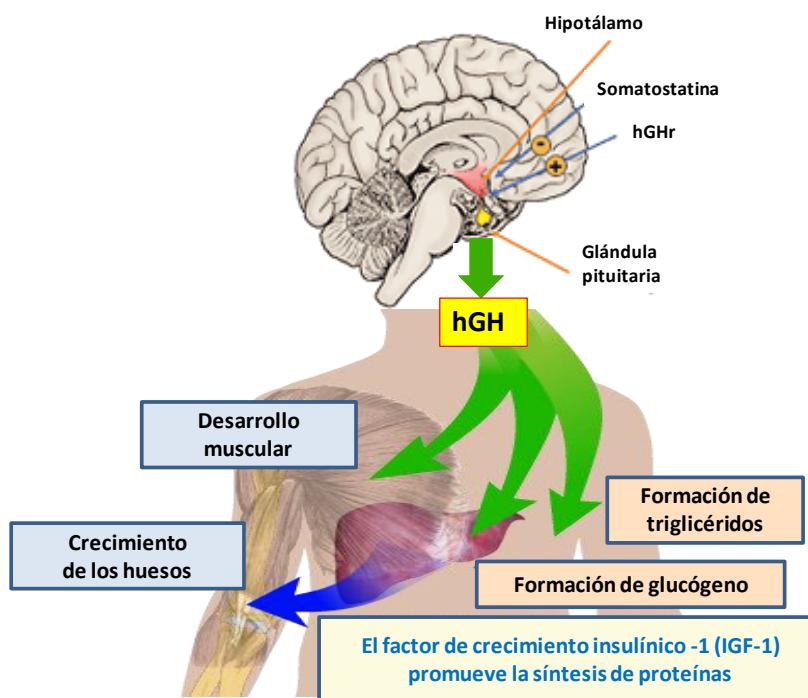


Figura 9.- Producción y efectos de la hGH

Una característica de la síntesis y secreción de la hGH es que tiene lugar de manera pulsativa a lo largo del día, con picos de producción en torno a 10-20 ng/mL [Fedi, 2008] y mínimos con una concentración inferior a 1 ng/mL. Además, el nivel más alto se alcanza aproximadamente una hora después del comienzo del sueño [Mullington, 1996; Van Cauter, 2004]. La concentración de hGH viene determinada también por otros factores, como el ejercicio físico, la dieta, la edad, el estrés, y las concentraciones de otras hormonas como la grelina [Wren, 2000].

La determinación de hGH es necesaria para el diagnóstico de diferentes enfermedades de la infancia relacionadas con el crecimiento y para detectar la presencia de tumores pituitarios. Asimismo, la detección de esta hormona es importante en medicina deportiva, ya que su ingestión está prohibida por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). Como tanto su exceso como su deficiencia tienen un fuerte efecto fisiológico, se requieren métodos analíticos capaces de determinar la hormona en un amplio intervalo de concentraciones.

A pesar de su importancia, los métodos usados para la determinación de hGH en los laboratorios de análisis clínicos se basan generalmente en la aplicación de metodologías tipo ELISA, que presentan algunos inconvenientes como son la falta de sensibilidad y de precisión de las medidas, el prolongado tiempo de análisis y el elevado consumo de reactivos. Por otro lado, en el control del dopaje deportivo se utilizan metodologías basadas mayoritariamente en el empleo de técnicas cromatográficas con detección mediante espectrometría de masas (GC/MS o LC/MS). Estas técnicas garantizan la plena identificación de la hormona en muestras de orina o sangre, si bien presentan un coste de inversión y de mantenimiento instrumental muy elevados, y carecen de portabilidad, debiendo ser necesariamente utilizadas en los laboratorios analíticos de control.

En la Tabla 10 se han resumido las características analíticas de varios inmunosensores para hGH descritos en la bibliografía.

Como puede apreciarse, se han propuesto varias metodologías empleando la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) para esta hormona, aplicadas a muestras de suero, con un límite de detección de 4 ng/mL [Treviño, 2009], así como a la de varias hormonas pituitarias, hGH, hTSH (estimulante del tiroides) y hFSH (estimulante del folículo) en suero y orina, con un margen de trabajo entre 33 y 1337 ng/mL [Treviño, 2009a]. Más recientemente se ha puesto a punto una configuración basada en el empleo de fragmentos de anticuerpos obtenidos por tratamiento de anti-hGH convencional con 2-mercapto-etilamina [Kausaite-Minkstimiene, 2013]. Se ha desarrollado también un inmunosensor impedimétrico en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre un electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro sobre una monocapa de 1,6-hexanoditiol, y se miden los espectros de impedancia electroquímica en una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. El método presenta un límite de detección de 0.64 pg/mL [Rezaei, 2009].

Tabla 10.- Características analíticas de los inmunosensores para la determinación de hGH

Técnica	Configuración	Método	I.L., ng/mL	LOD	RSD, %	Estabilidad, días	Tiempo de ensayo, min.	Muestra	Ref.
EIS	anti-hGH / AuNPs / HDT / AuE	SAM de HDT; inmov. AuNPs; inmov. anti hGH a pH 4.4; EIS en $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	0.003 - 0.1 ($r=0.997$)	0.64 pg/mL	1.77 (n=8) (0.1ng/mL) el mismo día	-	120	Suero humano enriquecido	Rezaei, 2009
SPR	anti-hGH-hGH- SAM / Au	Inmov. covalente de hGH sobre SAM; ensayo comp. indir. con anti-hGH en la muestra	-	6 ng/mL	2.2	50 medidas	-	Suero humano	Treviño, 2009
SPR	anti-hGH-hGH- SAM / Au	Inmov. covalente de hGH sobre SAM; ensayo comp. indir. con anti-hGH en la muestra	18 - 542	4 ng/mL	5	-	-	Suero humano , orina	Treviño, 2009a
SPR	anti-hGH25-hGH 20 (o anti-GH33- hGH22)-anti-hGH 12-biotin-strep- biotin-AM / Au(Ti)	SAM mixta 11-MUOH/ 16- HDA 50/1 biotin + strep sobre Au; inmov. anti-hGH 12-biotin + hGH 20 y 22; adic. de anti-hGH25 y 33	1-1500 (hGH20) 0.5-50 (hGH22)	0.9 ng/mL (hGH 20 y 22)	7.16; 6.7	-	-	-	de Juan- Franco, 2013
SPR	frag-hGH / Au	Reducción y fragmentación de anti-hGH con 2-MEA; inmovilización de frag-hGH en el Au-chip de SPR por quimisorción	221 - 1593	75 ng/mL	6.2 (n=3)	18		Suero humano enriquecido	Kausaite- Minksti- miene, 2013

CLAVE: EIS, espectroscopía de impedancia electroquímica; AuNPs, nanopartículas de oro; HDT, 1,6-hexanoditiol; SPR, resonancia de plasmón superficial; 2-MEA, 2-mercaptoetilamina; 11-MUOH, 11-mercaptoundecanol; 16-MHDA, ácido 16-mercaptohexadecanoico.

Por otro lado, al igual que para otras especies de interés clínico, también existen varios kits de inmunoensayo tipo ELISA comerciales. En la Tabla 11 se han resumido las características analíticas de los más utilizados.

Como puede observarse, la mayoría se basa en esquemas de inmunoensayo de tipo sandwich utilizando anticuerpos de detección marcados con HRP, en los que la formación del inmunocomplejo se detecta colorimétricamente con TMB y peróxido de hidrógeno. En algún caso se emplean conjugados de estreptavidina o avidina marcados con HRP, y en uno se hace uso de un conjugado de digoxigenina, desarrollándose la coloración con ABTS. También se ha desarrollado un sistema con detección fluorimétrica en el que se utiliza un anticuerpo marcado con europio y un revelador que contiene un reactivo disociante del complejo Eu-anticuerpo y otro formador de un complejo luminiscente. Por otro lado, existe una gran variabilidad en las características analíticas que presentan estos sistemas. Por un lado, el intervalo dinámico de los calibrados se extiende a concentraciones que alcanzan valores máximos de 40 - 50 ng/mL, y límites de detección que pueden llegar aproximadamente a 2 pg/mL. También son muy diferentes los tiempos de ensayo, que oscilan entre más de cuatro horas y 40 min.

Tabla 11.- Sistemas ("kits") comerciales para la determinación de hGH

Sistema	Método	Características analíticas	Muestra
DSL-10-1900 active hGH ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.hasta 40 ng/mL LOD, 0.03 ng/mL Precisión: 4.3%(intra); 6.6%(inter) Tiempo de ensayo, 1h 40 min	Suero
1244-0.41 Delfia hGH Perkin Elmer	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-Eu. Detec. fluorim	I.L.hasta 38 ng/mL, LOD,0.011 ng/mL Tiempo de ensayo, ≈2h	Suero
Abcam, ab 10 0526 GH human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH, anti-hGH -Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/ H ₂ O ₂	I.L. 1.4 - 400 pg/mL, LOD, < 4 pg/mL. Precisión: <10% (intra); <12% (inter). Tiempo de ensayo, 4h 45 min	Suero, plasma y cultivos
GenwayBio hGH ELISA kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH, anti-hGH -Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/ H ₂ O ₂	I.L.15.6-1000 pg/mL,LOD: < 2 pg/mL, Tiempo de ensayo: 3h 20 min	Suero, plasma y cultivos
Quantiline ELISA kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.hasta 1600 pg/mL,LOD, 2.1 pg/mL Tiempo de ensayo, 4h	Suero, plasma y cultivos
Roche hGH ELISA 7.0	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH, anti-hGH-DIG y anti-DIG-HRP. Detec. colorim. con ABTS	I.L.10 - 400 pg/mL, LOD, 5 pg/mL, Tiempo de ensayo, ≈4h	Cultivos
Alpco hGH ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. hasta 50 ng/mL, LOD, 0.5 ng/mL. Precisión: 2.9% (intra); 4.4% (inter). Tiempo de ensayo, 1h 20min	Suero
Abnova GH ELISA kit KA0215	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. hasta 50 ng/mL, LOD, 0.5 ng/mL. Tiempo de ensayo, 1h 05min	Suero
Calbiotech hGH ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-hGH y anti-hGH-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.: hasta 40 ng/mL, LOD, 0.2 ng/mL. Tiempo de ensayo, 40min	Suero

CLAVE: DIG: digoxigenina; ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

3.2.3.5. Prolactina (PRL)

La prolactina (PRL) (Figura 10) es una hormona polipeptídica de masa molecular 23 kDa con una cadena de 199 aminoácidos y tres enlaces disulfuro, segregada por la parte anterior de la hipófisis, la adenohipófisis. Con sus más de cien efectos conocidos en el organismo, es una de las hormonas más versátiles en términos de acciones biológicas, aunque las más conocidas son la estimulación de la lactancia, la regulación del crecimiento y la diferenciación de las glándulas mamarias [Sinha, 1995].

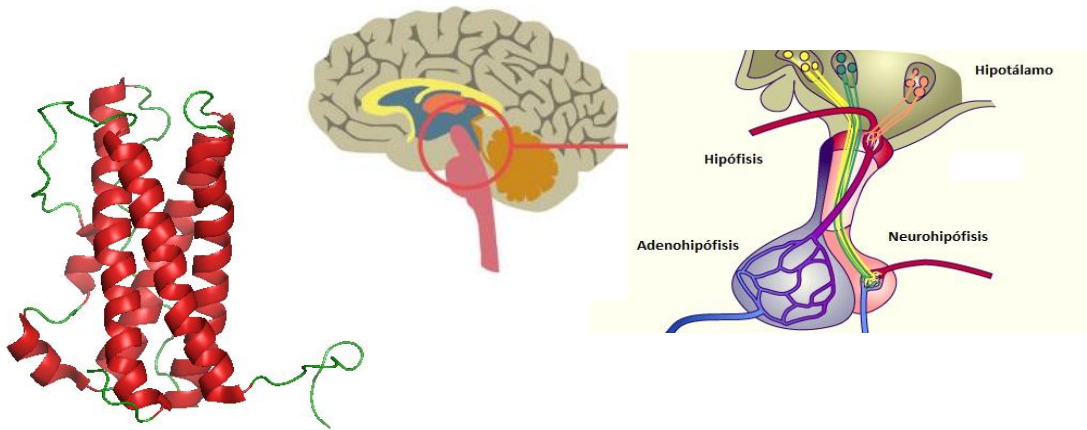


Figura 10.- Estructura de la prolactina y representación del sistema hipofisario

La Figura 11 muestra un esquema de los factores de regulación y acciones de la prolactina. Algunos medicamentos tranquilizantes, antidepresivos, drogas, opiáceos, la reserpina o la metildopa ejercen un efecto inhibitorio sobre esta hormona. La dopamina inhibe la síntesis y la secreción de prolactina, mientras que el estrés y la hormona liberadora de la tirotropina (TRH), el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), la serotonina (5-HT) y los traumas torácicos, son factores estimulantes. Los estrógenos, principalmente el β -estradiol, son potentes estimuladores de la prolactina, disminuyendo además la eficiencia inhibitoria de la dopamina y aumentando la respuesta a la TRH. Por otro lado, el reflejo de succión en el pezón, mediado por el VIP, también estimula la producción de prolactina. En cuanto a sus acciones, esta hormona aumenta la

secreción de leche, destacando entre sus efectos sobre las células de los alveolos mamarios, un aumento de la síntesis de lactosa y una mayor producción de proteínas lácteas como la caseína y la lactoalbúmina. Por otra parte, dicha secreción solo tiene lugar después del parto, dado que la elevada presencia de estrógenos en la mujer embarazada tiene un efecto inhibitor.

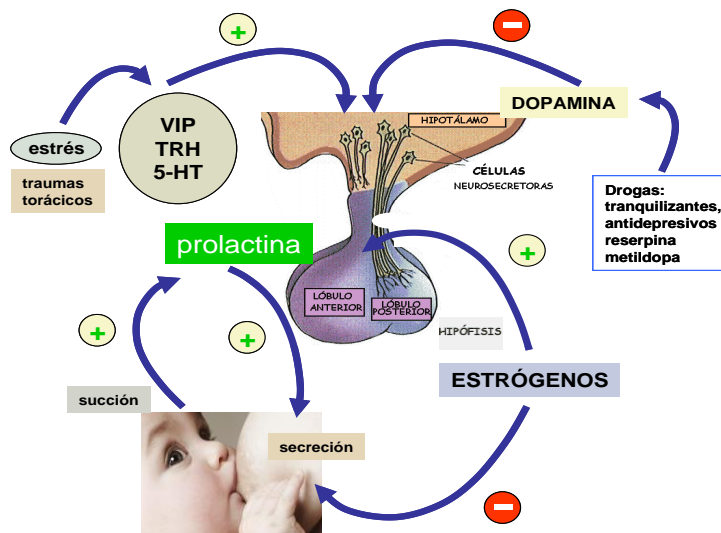


Figura 11.- Regulación y acciones de la prolactina

Las concentraciones normales de prolactina en sangre se encuentran en el intervalo de 2 a 18 ng/mL en hombres y 2 a 25 ng/mL en mujeres, variando de 10 a 209 ng/mL durante el embarazo. La determinación de esta hormona en suero es necesaria para el estudio de trastornos menstruales en las mujeres, galactorrea, hipogonadismo o infertilidad, entre otras enfermedades. Este parámetro también es útil para diagnosticar los desórdenes de la pituitaria hipotalámica. Los microadenomas (pequeños tumores pituitarios) pueden causar hiperprolactinemia. Cuando esta se confirma por medida de concentraciones superiores a 35 ng/mL en dos análisis repetidos, debe investigarse la posibilidad de un prolactinoma [Souter, 2010]. En este sentido, cabe destacar la importancia de la determinación conjunta de PRL y hGH en el diagnóstico de los diferentes adenomas pituitarios que se caracterizan por cursar con alteraciones por secreción excesiva de una de estas hormonas. Aparte de esta relación, existen otras circunstancias comunes. Por ejemplo, la medida de la relación hGH/PRL es importante en el estudio de la formación de tumores mamarios [Wennbo, 2000]. Las dos hormonas participan

en el desarrollo del tejido adiposo [Flint, 2003] actuando ambas como antagonistas de la insulina [Ling, 2003]. Finalmente, desempeñan importantes papeles en la regulación de los mecanismos neuroprotectores y/o neurorestauradores del cerebro [Pathipati, 2011].

Se han propuesto distintos tipos de inmunoensayos para la determinación de prolactina. Un ejemplo es el desarrollado para su aplicación a leche de rumiantes (*Bos frontalis*) basado en la inmovilización del anticuerpo sobre microplacas y el establecimiento de un ensayo competitivo con detección colorimétrica empleando prolactina biotinilada y estreptavidina marcada con peroxidasa [Mondal, 2007]. Una configuración similar fue utilizada por el mismo grupo para la cuantificación de prolactina en plasma de búfalo [Roy, 2007], y para la determinación de oxitocina y prolactina en plasma de yak [Sarkar, 2006]. Además, se han descrito otras configuraciones disponibles comercialmente en forma de “kits”. En la Tabla 12 se han resumido las características analíticas de algunos ejemplos representativos.

Como puede observarse, la mayoría de los ensayos disponibles son de tipo ELISA en configuración sandwich en los que se utilizan anti-PRL y anti-PRL marcada con peroxidasa, así como TMB y peróxido de hidrógeno para detectar colorimétricamente la formación del inmunocomplejo. Algunos sistemas se basan en un esquema similar aunque se emplean reactivos biotinilados y estreptavidina o avidina marcadas con HRP. El denominado “AlphaLISA”, de Perkin Elmer, es un ensayo inmunofluorimétrico en el que se usan partículas aceptoras y dadoras con anti-PRL y anti-PRL biotinilada, respectivamente. La detección se basa en la técnica FRET (transferencia de energía de fluorescencia de resonancia). Sobre las primeras se hace incidir radiación de excitación por láser, produciéndose una emisión de radiación a 615 nm cuando tiene lugar la unión al antígeno. Los intervalos dinámicos se extienden, en la mayoría de los casos, en el intervalo de las unidades a una o dos centenas de ng/mL, con límites de detección de unas décimas de ng/mL. Al igual que en otros casos, los tiempos de ensayo son muy diversos, encontrándose los tiempos más largos (hasta cinco horas) en las configuraciones que emplean reactivos biotinilados. En algunos protocolos se indican tiempos tan breves como 50 min.

Tabla 12.- Sistemas ("kits") comerciales para la determinación de PRL

Sistema	Método	Características analíticas	Muestra
Biovendor Human PRL ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL y anti-PRL-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.hasta 123 ng/mL, LOD 0.39 ng/mL, Precisión: 6.9% (intra); 11.6% (inter). Tiempo de ensayo, 1h 35 min	Suero
R&D Systems Human PRL Quantikine™ ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL, anti-PRL-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.1.56-100 ng/mL, LOD 0.127 ng/mL, Precisión: 3.4-5.1% (intra); 4.8-5.8% (inter). Tiempo de ensayo, 5 h	Suero, plasma
DIA source PRL ELISA KAPDI29I	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL y anti-PRL-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 5-200 ng/mL, LOD, 0.35 ng/mL, Precisión: 2.9-5.9% (intra); 5.6-6.2% (inter). Tiempo de ensayo, 50 min	Suero
Perkin-Elmer Alpha LISA	Inmunoensayo luminiscente (FRET) tipo sandwich. Anti-PRL inmov. sobre part. acept. Part. donantes marcadas con strep y anti-PRL-Biotin.	I.L.0.125-300ng/mL LOD, 0.125 ng/mL Tiempo de ensayo, 90 min	Suero
GenWay PRL ELISA 40-056-205018	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL y anti-PRL-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.35- 200ng/mL, LOD, 0.35 ng/mL, Precisión: 2.9-5.9% (intra); 5.6-6.2% (inter). Tiempo de ensayo, 50 min	Suero
Uscn Life Sci. Inc. sandwich ELISA	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL, anti-PRL-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.: 4.7-75.8 ng/mL, LOD, 1.5 ng/mL. Tiempo de ensayo, 1h 50 min	Suero, plasma y leche
Abcam, PRL human ELISA kit (ab108679)	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL y anti-PRL-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 5-100 ng/mL, LOD, 0.25 ng/mL, Precisión: 4.8-6.3% (intra); 5.0-6.8% (inter). Tiempo de ensayo, 50 min	Suero y plasma
MyBioSource PRL ELISA kit MBS590032	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL y anti-PRL-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 1.5-200 ng/mL, LOD, 1.5 ng/mL. Tiempo de ensayo, 50 min	Suero
Hölzel Dagnóstika	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-PRL, anti-PRL-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.1.56 - 100ng/mL, LOD, 0.56 ng/mL, Precisión: <10% (intra); <12 (inter). Tiempo de ensayo, 3h 50 min	Suero y plasma

CLAVE: FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer.

En lo que respecta al empleo de inmunosensores, hay que destacar la escasez de configuraciones descritas en la bibliografía para esta hormona. En 2002 se propuso el empleo de un dispositivo multianalito para la determinación de folitropina, gonadotropina y prolactina en suero humano, basado en el empleo de un tubo capilar recubierto por los diferentes anticuerpos específicos, y detección con ayuda de un anticuerpo biotinilado y estreptavidina marcada con el reactivo fluorescente R-ficoeritrina **[Petrou, 2002]**.

Recientemente, nuestro grupo puso a punto un magnetoinmuno sensor electroquímico empleando electrodos serigrafiados y partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina sobre las que se inmovilizaba el anticuerpo de captura. Una vez preparado el inmunoconjugado tipo sandwich con prolactina y anti-PRL marcado con fosfatasa alcalina, éste se inmoviliza sobre el electrodo y se mide la señal de oxidación del 1-naftol formado en la reacción enzimática empleando 1-naftilfosfato como sustrato. El calibrado para PRL es lineal en el intervalo de 10 a 2000 ng/ml, alcanzándose un límite de detección de 3.74 ng/mL **[Moreno-Guzmán, 2011]**. También se ha descrito una configuración basada en la preparación de conjugados HRP-anti-PRL sobre nanopartículas de oro modificadas con poli(o-fenilendiamina) (GPPD) y en el empleo de anti-PRL inmovilizado sobre un electrodo de carbono vitrificado. En este caso, el intervalo dinámico abarca concentraciones de prolactina entre 0.5 y 180 ng/mL, con un límite de detección de 0.1 ng/mL **[Chen, 2012]**.

directamente en el hígado donde desempeña un papel antagonista de la insulina inhibiendo la gluconeogénesis (síntesis de la glucosa a partir de precursores no glucídicos), así como sobre las células grasas favoreciendo la lipólisis. Esto conduce a un incremento de los niveles de glucosa. Por su parte, la hormona IGF-1 disminuye la concentración de glucosa en sangre directamente mediante la inhibición de la gluconeogénesis renal. Pero además, esta hormona también puede actuar indirectamente a través del receptor de IGF-1 en el músculo, para aumentar la acción de la insulina sobre el transporte de la glucosa. Finalmente, la IGF-1 actúa como inhibidora de la secreción de hGH por la glándula pituitaria, bloqueando entonces indirectamente la capacidad de esta hormona de antagonizar la acción de la insulina. Este efecto indirecto favorece la homeostasis (estabilidad en los niveles) de la glucosa.

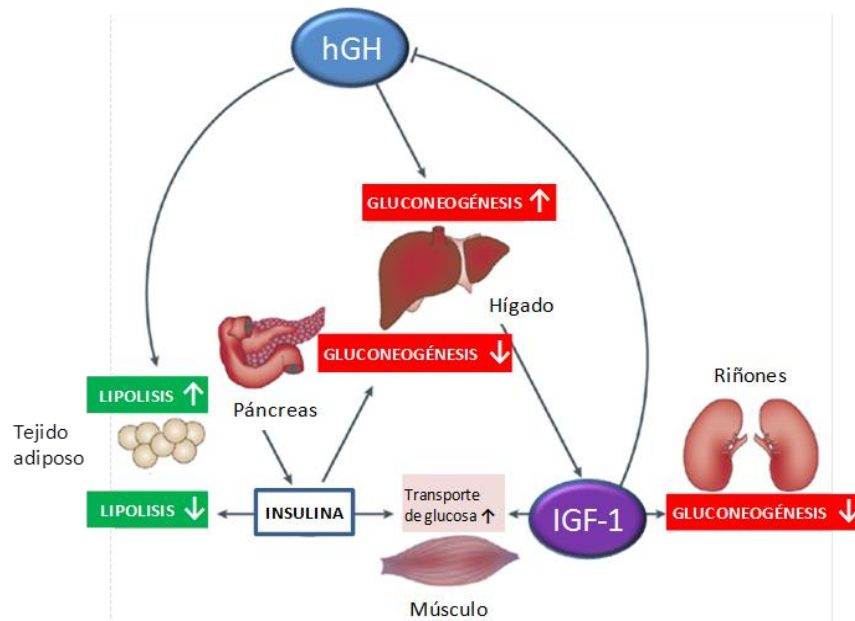


Figura 13.- Acción de la IGF-1 en combinación con la hGH.
(Modificado a partir de [Clemmons, 2007])

En la bibliografía consultada, únicamente se ha encontrado la descripción de un inmunosensor para IGF-1, en el que se utiliza la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, inmovilizando el anticuerpo de captura sobre electrodos de oro modificados con

una monocapa de 1,6-hexanoditiol. Se obtiene un calibrado lineal en el intervalo de 1.0 a 180 pg/mL, así como un límite de detección de 0.15 pg/ml [Rezaei, 2011].

Existen, sin embargo, muchos kits ELISA comerciales, de los que se han recogido algunos ejemplos en la Tabla 13.

Como puede verse, la mayoría se basan en ensayos de tipo sandwich con anti-IGF1 biotinilado como anticuerpo de detección, y conjugación con avidina- o estreptavidina-HRP. Sus calibrados alcanzan las unidades o unas pocas decenas de unidades de ng/mL, con límites de detección bajos, en torno a las decenas de pg/mL, y tiempos de ensayo muy largos (el más breve requiere 2h 15 min).

Tabla 13.- Sistemas ("kits") comerciales para la determinación de IGF-1.

Sistema	Método	Características analíticas	Muestra
RayBio-Human IGF1 ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.25–60 ng/mL, LOD <0.2 ng/mL, Precisión: <10% (intra); <12% (inter). Tiempo de ensayo, 4h 45 min	Suero, plasma y orina
Abcam ab100545 IGF1 human ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.123–30 ng/mL, LOD: <0.1 ng/mL, Precisión: <10% (intra); <12% (inter). Tiempo de ensayo, 4h 45 min	Suero, plasma y orina
Uscn E90050Hu ELISA Kit for human IGF1	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.094-6.0 ng/mL, LOD: <0.03, Precisión: <10% (intra); <12% (inter). Tiempo de ensayo, 4h	Suero, plasma y otros fluidos
Biorbyt Human IGF1 ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.0625 - 2 ng/mL Tiempo de ensayo, 4h	Suero y plasma
Komabiotech Human IGF1 ELISA Kit K0332112	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L.0.032 - 2 ng/mL Tiempo de ensayo, 4h 30min	Suero, plasma y otros fluidos
Enzo IGF1 (human) ELISA Kit ADI-900-150	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1 inmov., IGF1, anti-IGF1 + HRP-anti-IgG. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L 0.187 - 6 ng/mL, LOD: 0.034 ng/mL. Precisión: 3.6-8.9% (intra); 3.4-10.9 (inter). Tiempo de ensayo, 4h 30min	Suero y plasma
OmniKine Human IGF1 ELISA Kit OK-0225	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y avidin-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 0.031 - 2 ng/mL, Tiempo de ensayo, 4h 30min -	Suero y plasma
DRG Diagnosis IGF1 600 ELISA	Inmunoensayo competitivo con anti-IGF1, IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim, con TMB/H ₂ O ₂	I.L. hasta 0.6 ng/mL. Tiempo de ensayo, 3h 55min	Suero
Quantiline ELISA Kit for human IGF1	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1 inmov., IGF1, anti-IGF1 + HRP-anti-IgG + Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. hasta 6 ng/mL, LOD: 0.026 ng/mL, Precisión: 3.5-4.3% (intra); 7.5-8.3 (inter). Tiempo de ensayo, 4h	Suero y plasma
AssayPro Human IGF1 ELISA Kit EI1001-1	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L 0.75- 24 ng/mL, LOD: 0.7 ng/mL, Precisión: 4.8% (intra); 7.2 (inter), Tiempo de ensayo, 4h 50 min	Suero y plasma
BioVendor Human IGF1 ELISA Kit RMEE20	Inmunoensayo tipo sandwich con anti-IGF1, anti-IGF1-Biotin y strep-HRP. Detec. colorim. con TMB/H ₂ O ₂	I.L. 2-50 ng/mL, LOD: 0.09 ng/mL. Precisión: 5.08-6.65% (intra); 2.25 -6.79% (inter). Tiempo de ensayo, 2h 15min	Suero

4

Parte Experimental

4.1. INSTRUMENTACIÓN

4.1.1. Aparatos

Los equipos utilizados en las investigaciones realizadas se han resumido en las Tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14.- Equipos electroquímicos empleados




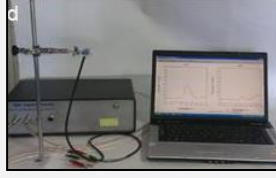


Técnica	Equipo	Software	Imagen
Medidas voltamperométricas	Autolab PGSTAT 12	GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System) (EcoChemie B.V)	
	Autolab PGSTAT 101	Nova 1.6 (EcoChemie B.V)	
	BAS (West Lafayette, IN, USA) modelo 100B	BAS 100/W (Bioanalytical System)	
Electrodos Duales	(DUALES) CH Instruments 1030 B (8 canales)	—	
Amperometría	Detector multicanal BAS Epsilon	Chromgraph 2.0.01 (Bioanalytical System)	
Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)	μ -Autolab Tipo III	FRA2 (Ecochemie)	

Tabla 15.- Equipos externos utilizados

Técnica	Equipo	Obsevaciones
Medidas espectrofotométricas	Espectrofotómetro con detector de fotodiodos serie HP 8453	Software HP 845x UV – Visible System
ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica	JEOL JSM 6400 JEOL JEM 2100 PHILIPS CM 200 FEG	ICTS (Centro Nacional de Microscopía Electrónica)

Tabla 16.- Otros equipos empleados

Equipo	Modelo	Observaciones
pH - metro	Crison modelo Basic 20+	Calibrado diariamente con disoluciones reguladoras de pH 4.01, 7.00 y 9.21 a 25 ± 0.5 °C
Baño de ultrasonidos	P – Selecta Ultrasons	–
Incubador	Optic Ivymen System modelo Comecta S.A.	Provisto de agitación y sistema de control de temperatura
Homogeneizador	Heidolph Reax Top	–
Horno	Meditronic P-Selecta	–

4.1.2. Electrodo y células de trabajo

Las medidas electroquímicas se han realizado utilizando montajes potencioestáticos de tres electrodos con un electrodo de trabajo (dos, en el caso de los sistemas duales), un electrodo de referencia o de pseudo-referencia y un electrodo auxiliar.

4.1.2.1. Electrodo

Los experimentos se han llevado a cabo empleando electrodos de pasta de nanotubos de carbono y teflón preparados en el laboratorio según el procedimiento que se describe en el Apartado 4.5.1., así como electrodos de carbono vitrificado (CH Instruments) (Figura 14). Además se han utilizado diferentes tipos de electrodos serigrafados (DropSens) (Figura 15).

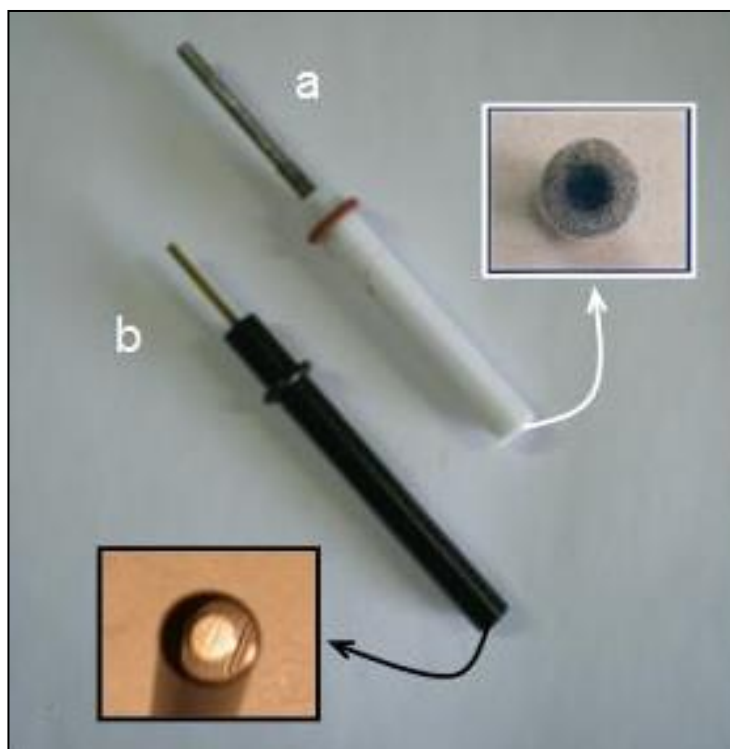


Figura 14.- (a) Electrodo compuesto de nanotubos de carbono/teflón (3 mm \varnothing) y (b) electrodo de carbono vitrificado CHI 104 (3 mm \varnothing)

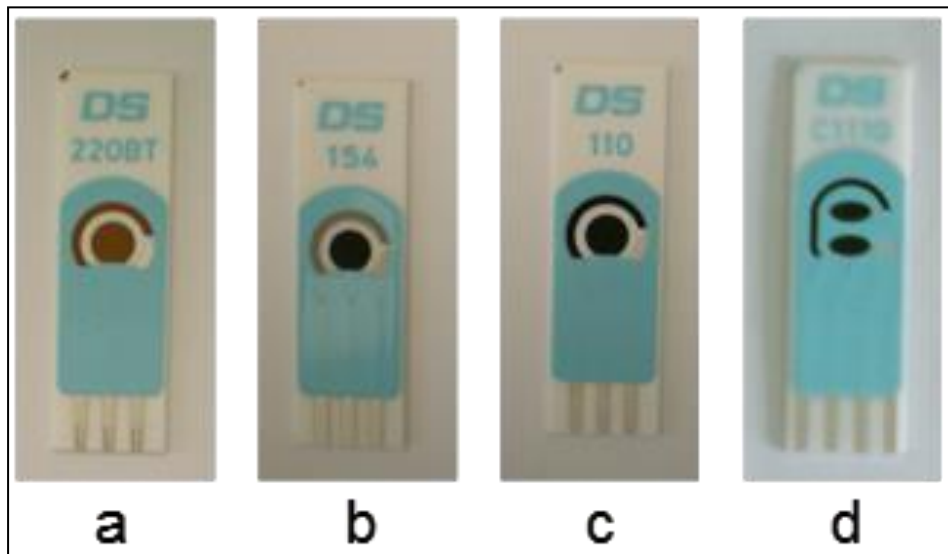


Figura 15.- Electrodos serigrafiados (a) de oro de baja temperatura (pseudo- referencia de Ag y auxiliar de Au); (b - d) de carbono (pseudo-referencia de Ag/AgCl (b) o de Ag (c, d) y auxiliar de Pt (b), o carbono (c, d)).

4.1.2.2. Células electroquímicas

Las medidas con los electrodos compósitos y de carbono vitrificado se han realizado en células electroquímicas de 10 mL modelo BAS VC-2, como la que se muestra en la Figura 16a, empleando además un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M BAS MF2063 y un electrodo auxiliar de alambre de platino preparado en el laboratorio. Estas células se utilizaron también para las medidas con los electrodos serigrafiados.

Las medidas con el magnetoinmuno sensor se llevaron a cabo sobre una gota de 50 μ L del medio de trabajo depositada sobre la parte activa del electrodo serigrafiado previamente insertado en un bloque de teflón provisto de un imán, del modo que se indica en la Figura 16b.

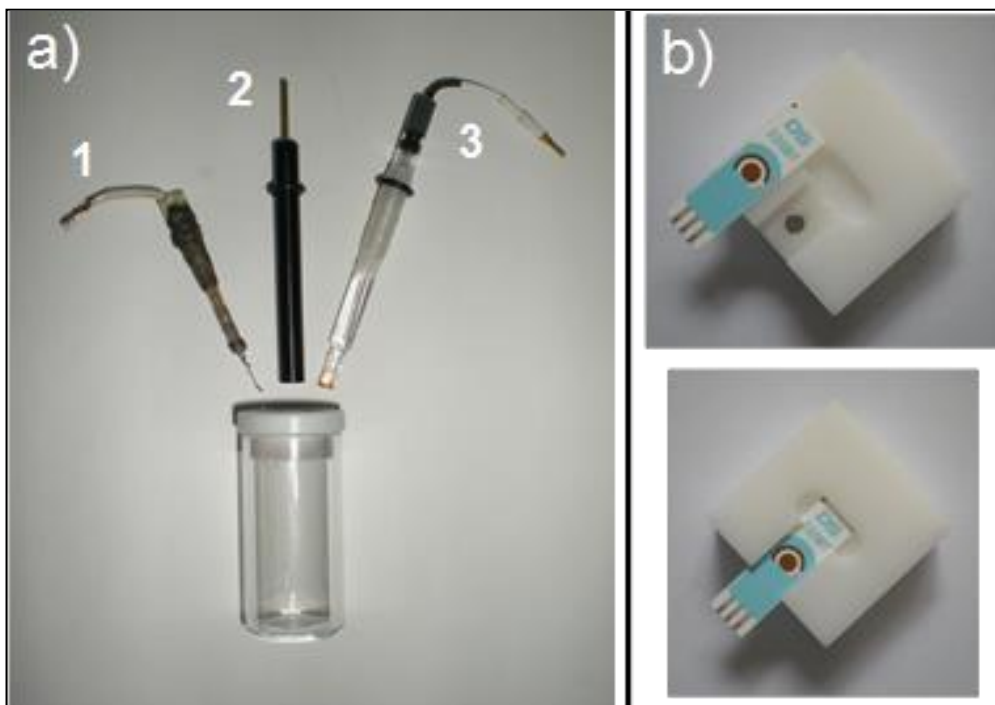


Figura 16.- (a) Célula electroquímica BAS VC-2 de 10 mL y electrodos utilizados: electrodo auxiliar de Pt (1); electrodo de trabajo (2); electrodo de referencia de Ag/AgCl (3). (b) Acoplamiento del electrodo serigrafiado al soporte de medida.

4.1.3. Otros materiales

- Equipo de filtración de disolventes compuesto por un soporte filtro hembra, un embudo soporte, un kitasato de 1 L macho y una pinza (Scharlab) donde se colocan los filtros de membrana de Nylon de 0.1 y 0.45 μm de diámetro de poro.
- Imán de neodimio Aiman GZ.
- Separador magnético o concentrador de partículas Dynal MPC-S (Dynal Biotech ASA) (Figura 17).



Figura 17.- Concentrador de partículas antes (izquierda) y después (derecha) de aplicar el campo magnético.

- Dispositivo colector de saliva Salivette (Sarstedt) provisto de torundas de algodón y tubos de centrifugación (Figura 18).

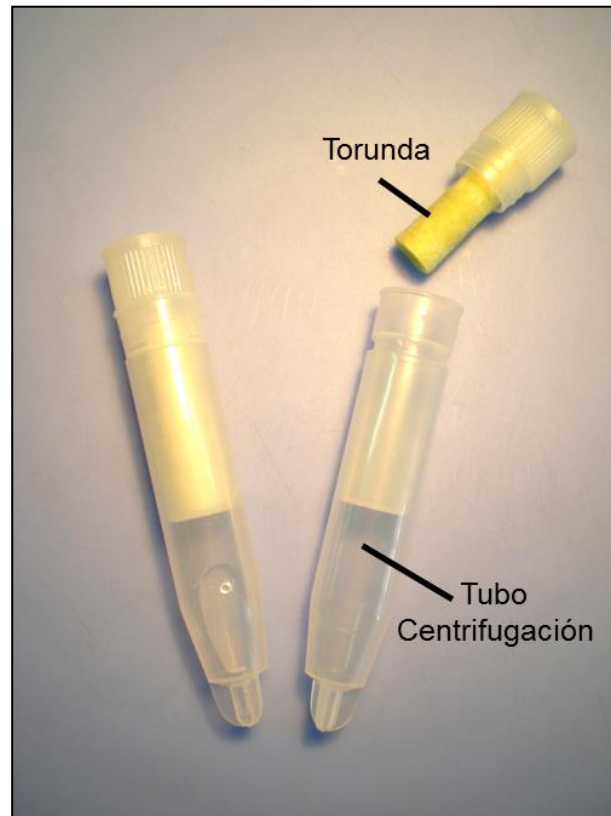


Figura 18.- Dispositivo colector de saliva

4.2. REACTIVOS

4.2.1. Enzimas

Para la preparación de los biosensores se han utilizado: glucosa oxidasa (GOx, Sigma, 151.000 U/g sólido), tirosinasa (TYR, extraída de champiñón, 2034 U/g sólido, Sigma-Aldrich), alcohol deshidrogenasa (ADH, extraída de levadura de pan, 451 U/g sól. Sigma-Aldrich), mirosinasa (MI, tioglucosidasa de *Sinapsis alba*, extraída de semillas de mostaza blanca, Sigma 361 U/g sól.), creatininasa (CA, Sigma-Aldrich, 117 U/g sól.), creatinasa (CI, Sigma-Aldrich, 12 U/g sól.), sarcosina oxidasa (SO, Sigma-Aldrich, 41 U/g sól.) y peroxidasa (HRP, Sigma-Aldrich, 224 U/mg sól.).

4.2.2. Sutratos enzimáticos y cofactores

En las reacciones enzimáticas han participado las siguientes especies: glucosa (Panreac, >99%), sinigrin (glucosinolato) (Sigma-Aldrich, >99%), etanol (Panreac, 96%), fenol (Prolabo, 99.5%), peróxido de hidrógeno (Scharlau, 35%), creatinina (Sigma-Aldrich, 99%), sarcosina (Sigma-Aldrich, 99%), creatina (Sigma-Aldrich, 99%), 4-aminofenilfosfato (Abyntek), 1-naftilfosfato (Sigma, 99 %), β -nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida (NADH, Sigma-Aldrich) y β -nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada (NAD⁺, Sigma-Aldrich).

4.2.3. Mediadores redox

Se utilizó ferroceno (Fc, Fluka, >98%) como mediador redox en el biosensor multienzimático de creatinina, y catecol (Sigma-Aldrich, 99%) en la configuración del inmunosensor para IGF1.

4.2.4. Anticuerpos

Para la preparación de los inmunosensores se utilizaron los siguientes inmunorreactivos: anticuerpo monoclonal de ratón para la hormona del crecimiento humana (hGH) (m-anti-hGH, Abcam), anticuerpo secundario policlonal de oveja marcado con fosfatasa alcalina (AP-anti-IgG, Abcam), anticuerpo policlonal de oveja para hGH (p-anti-hGH, Abcam), anticuerpo policlonal de oveja para el factor de crecimiento insulínico 1 humano, marcado con peroxidasa (HRP-anti-IGF, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón [1F6–3H10] para IGF1 humano, (anti-IGF1, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón para prolactina (anti-PRL, Immunometrics), y anticuerpo monoclonal de ratón para prolactina, marcado con fosfatasa alcalina (AP-anti-PRL, Immunometrics).

4.2.5. Hormonas

Como antígenos de los inmunosensores desarrollados se emplearon: somatotropina de pituitaria humana recombinante, expresada en *E coli*, de masa molecular 22 kDa (hGH, Sigma-Aldrich), prolactina (PRL, Immunometrics), y factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1, Abcam). En los estudios de interferencias se utilizaron también las siguientes especies: testosterona (Fluka, 99%), cortisol (Sigma-Aldrich, 98%), adrenocorticotropina humana (ACTH, GenWay, >95%), hormona folículo estimulante (FSH - Sigma – Aldrich) y progesterona (P, Sigma – Aldrich, 98%),

4.2.6. Productos empleados para la preparación de los electrodos

Se han utilizado nanopartículas de oro (AuNPs) (20 nm Ø, 7.2×10^{11} partículas /mL, Sigma), nanopartículas de poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT, 1 % en agua, Aldrich), teflón (poli(tetrafluoroetileno)) en polvo (Sigma-Aldrich), y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, Ø 30 ± 15 nm, Nanolab, 95%). Los nanotubos de carbono carboxilados (MWCNTs-COOH) se prepararon por tratamiento con ácido nítrico 2.6 M a reflujo durante 24 h. El producto resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, lavando repetidamente con agua destilada hasta pH 7, y secado en corriente de nitrógeno.

Para la preparación del magnetoinmosenor se utilizaron micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo (tosil-MBs-Dynabeads M-280 (Invitrogen) de 2.8 μm de diámetro). Además, se prepararon superficies electródicas modificadas con películas de PEDOT obtenidas a partir de 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT, Aldrich), así como de ácido poli(pirrolpropiónico (pPPA), obtenidas a partir de ácido pirrolpropiónico (PPA, Sigma-Aldrich, 97%). Se empleó también el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazonio (BMIMPF₆, IoLiTec, 99%).

4.2.7. Otros reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis. Además de los ya citados, también se emplearon los siguientes: clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, Acros) y sulfato de N-hidroxi-succimida (NHSS, Acros, 95%); BSA-Type VH (Gerbu, 100%), dopamina (Sigma), NaCl (Scharlau), CaCl₂ (Scharlau), glicina (Panreac, 99%), ácido glutámico (Across, 99%), ácido málico (Merk, 99%), ácido oxálico (Merk), ácido succinico (Merck), ácido tartárico (Sigma-Aldrich), ácido acético (Panreac, 99-100.5%), cisteína (Sigma-Aldrich), alil-isotiocianato (Sigma-Aldrich), fenetil-isotiocianato (Sigma-Aldrich), metionina (Sigma-Aldrich, > 99%), acetamino-fenol (Fluka, > 98%), ácido ascórbico (Fluka, > 99.5%), ácido úrico (Sigma, 99%), cloruro potásico (Scharlau), sales potásicas de hexacianoferrato (II) y hexacianoferrato (III) (Sigma-Aldrich), alúmina en polvo de 0.3 μm de tamaño de partícula (Metrohm 6.2802.00). También se utilizaron membranas de diálisis (Termo Scientific, 10 K MWCO Cultek[®]).

4.3. DISOLUCIONES

4.3.1. Disoluciones reguladoras de pH

Se utilizaron disoluciones reguladoras fosfato de pH 7.4 preparadas a partir de la mezcla de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 (Scharlau) a distintas concentraciones. También se empleó una disolución de fosfato 0.1 M + KCl 0.1 M de pH 4.5. Se prepararon disoluciones reguladoras a base de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) empleando diferentes reactivos: Trizma (Sigma) 0.1 M + MgCl_2 (Panreac) 1mM de pH 9.0, Tris-HCl (Scharlau, 99%) 0.1 M de pH 7.2, Tris-HCl 0.1 M + Tween 20 (Aldrich) 0.05 % de pH 7.2, y Tris-HCl 0.05 M + MgCl_2 0.01 M de pH 9.6.

4.3.2. Disoluciones de enzimas

Las disoluciones de tirosinasa y de alcohol deshidrogenasa se prepararon disolviendo cada enzima (400 U/ μL) en 200 μL de líquido iónico BMIMPF₆. La mezcla de enzimas creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa se preparó en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4. Las enzimas glucosa oxidasa, mirosinasa y peroxidasa se incorporaron directamente a las matrices de sus respectivos electrodos.

4.3.3. Disoluciones de sustratos enzimáticos y de mediadores redox

Las disoluciones patrón de glucosa 0.5 M, etanol 0.1 M, fenol 0.05 M, creatinina 0.02 M, creatina 0.02 M y sarcosina 0.02 M se prepararon en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4. En este mismo medio se prepararon también las disoluciones de NADH y NAD⁺ en concentración 0.1 M.

Para preparar las disoluciones de 1-naftilfosfato y de 4-aminofenilfosfato, ambas en concentración 0.05 M, se utilizaron, respectivamente, Tris 0.05 M de pH 9.6 que contenía MgCl_2 0.01 M, y Trizma 0.1 M de pH 9.6 que contenía MgCl_2 1 mM.

La disolución de catecol 0.05 M se preparó en medio regulador fosfato de pH 7.4. El mediador ferroceno se incorporó directamente a la matriz del electrodo.

4.3.4. Disoluciones de anticuerpos y de hormonas

Para la preparación de los inmunosensores se utilizaron las siguientes disoluciones: las de anti-IGF1 y de HRP-anti-IGF1, ambas a una dilución final 1/100, en medio fosfato 0.1 M que contenía KCl 0.1 M, a pH 4.5. Este mismo medio se empleó para preparar las disoluciones patrón del antígeno, IGF1, de 10 mg/mL. Las disoluciones de prolactina (PRL, 40 µg/mL), anti-prolactina (anti-PRL, 30 µg/mL) y AP-anti-PRL en dilución 1/100 se prepararon en medio regulador Tris 0.1 M de pH 7.2. Finalmente, para preparar las disoluciones de anti-hGH monoclonal (10 µg/mL), AP-anti-IgG (1 µg/mL), anti-hGH policlonal (dilución 1/1000) y hGH (50 µg/mL), se empleó un medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4.

4.3.5. Disoluciones de los monómeros usados para la preparación de los electrodos

Las películas de poli(3,4-etilendioxitiofeno) se obtuvieron por electrodeposición a partir de disoluciones 0.03 M del monómero EDOT en el líquido iónico BMIMPF₆. Las de ácido poli(pirrolpropiónico) se obtuvieron por electrodeposición a partir de disoluciones de ácido pirrolpropiónico (PPA) 0.1 M en disolución acuosa de KCl 0.5 M.

4.3.6. Otras disoluciones

Se prepararon disoluciones de peróxido de hidrógeno 0.01 M, metionina, acetaminofenol, glicina, ácido ascórbico y ácido úrico, todas ellas 0.02 M en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4. Las disoluciones de BSA en distintas concentraciones se prepararon en medio fosfato 0.1 M de pH 4.5 (con BSA al 1 %) y 7.4 (con BSA al 0.3 %), en presencia de KCl. Para las disoluciones de EDC y NHSS de 2 mg/mL cada una de ellas, se utilizó medio fosfato 0.1 M de pH 5.0.

Todas las disoluciones se prepararon con agua Milli-Q purificada mediante un sistema Millipore, Bedford, NA, USA

4.4. MUESTRAS

4.4.1. Muestras utilizadas para la validación de los biosensores enzimáticos

El biosensor de glucosinolato se validó mediante aplicación al análisis de muestras de semillas de coles de Bruselas aplicando el método que se describe en el Apdo. 4.6.1.

Para validar el biosensor de creatinina se analizaron muestras de referencia de suero humano liofilizado BCR® - 573 del Institute of Reference Materials and Measurements (Bélgica), con un contenido en creatinina de $68.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$. También se analizaron muestras de suero humano liofilizadas (Sigma, S-7394), enriquecidas con creatinina al nivel de 10, 50 y 90 μM . El procedimiento seguido se describe en el Apdo. 4.6.2.

Finalmente, el biosensor basado en la inmovilización de ADH sobre electrodos serigrafados de carbono modificados con nanopartículas de oro y PEDOT se validó por aplicación al análisis de una muestra de cerveza de bajo contenido alcohólico (Buckler $\leq 1\%$) y otra muestra certificada (BCR® 651, 0.505% etanol), aplicando el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6.3.

4.4.2. Muestras utilizadas para la validación de los inmunosensores

Para la validación del inmunosensor dual de hGH y PRL se analizaron muestras de suero humano liofilizado (Sigma, S-7394) enriquecidas con ambas hormonas a concentraciones de 1, 20 y 50 ng/mL (hGH) y 1, 20 y 200 ng/mL (PRL). El método utilizado para la preparación y análisis de estas muestras se recoge en el Apdo. 4.6.4. Además, este inmunosensor también se aplicó al análisis de saliva recogida de un voluntario y enriquecida con ambas hormonas a los niveles de 0.5, 2.5 y 5.0 ng/mL. En este caso, el procedimiento seguido se ha descrito en el Apdo. 4.6.4.

El magnetoinmunsensor de hGH se validó por aplicación a muestras del mismo suero enriquecidas con la hormona a concentraciones de 4.0 y 0.1 ng/mL. Para su preparación y análisis se aplicó el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6.5. Este mismo suero, enriquecido con 0.01 y 10.0 ng/mL de IGF1 se empleó también para la validación del inmunsensor para la determinación de esta hormona, aplicando el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6.6.

El inmunsensor de prolactina se aplicó también a muestras de suero enriquecido con 0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL de PRL, así como a muestras de orina certificadas (Liquichek Urine Chemistry Control, Level 1. BioRad 63221) enriquecidas con 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL de la hormona. Los métodos utilizados se han descrito en el Apdo. 4.6.7.

4.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.5.1. Preparación de los biosensores enzimáticos

4.5.1.1. Biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolatos

El esquema de la preparación de este biosensor se ha representado en la Figura 19. En primer lugar, se fabricó una pasta mezclando manualmente, durante diez minutos, 50 mg de MWCNTs y 90 μ L de la suspensión de oro coloidal. Una vez homogeneizada la mezcla, la pasta se llevó a sequedad con corriente de N_2 durante 2 horas y, a continuación, se incorporaron 1 mg de GOx y 20 mg de MYR agitando nuevamente durante 20 minutos. Finalmente se adicionaron 50 mg de teflón, mezclando como anteriormente hasta conseguir una completa homogeneización.

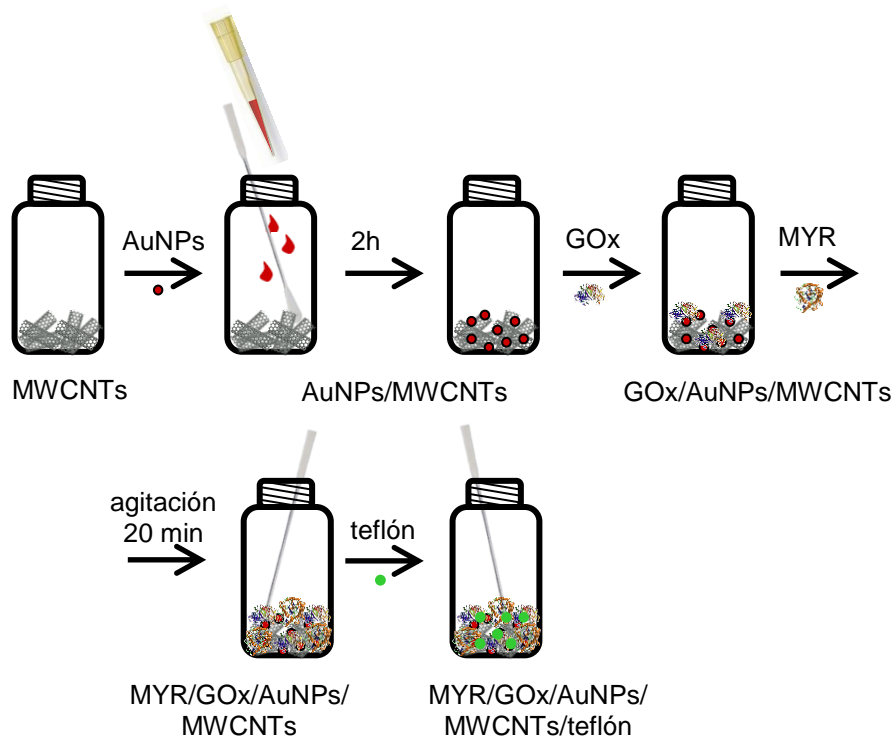


Figura 19.- Preparación de la mezcla compuesta para el biosensor de glucosinolatos.

A continuación, pequeñas porciones de la mezcla se insertaron por presión en cilindros de teflón huecos (3 mm de diámetro interno), introduciendo un tornillo de acero inoxidable por el otro extremo, hasta hacer contacto con la parte interna de la pasta. En la Figura 20 se ha representado un esquema del bioelectrodo y la secuencia de reacciones que tienen lugar en presencia de glucosinolato.

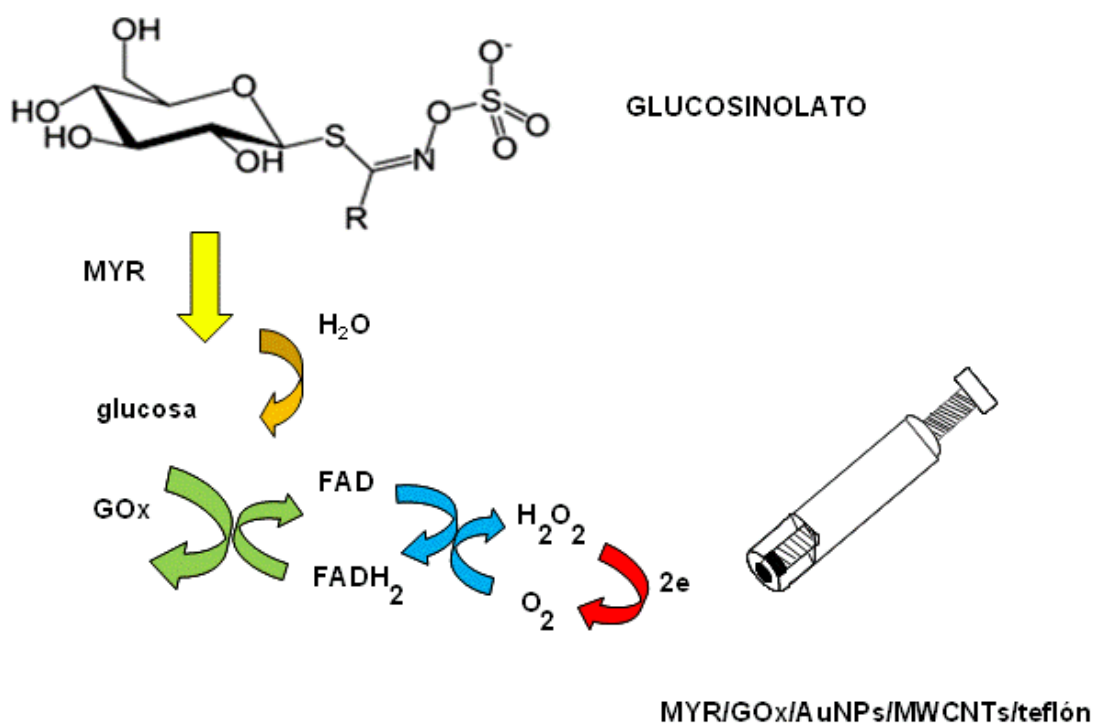


Figura 20.- Esquema del biosensor para la determinación de glucosinolatos.

4.5.1.2. Biosensor multienzimático para la determinación de creatinina

En la Figura 21 se muestra un esquema de la preparación de este biosensor. Como puede apreciarse, primero se fabricó una mezcla compósita, siguiendo el procedimiento anterior, que contenía 12.5 mg de MWCNTs, 90 μ L de suspensión de oro coloidal, 2 mg de ferroceno, 4 mg de HRP y 12.5 mg de teflón. Estos ingredientes se fueron incorporando secuencialmente, agitando después de cada adición hasta conseguir la completa homogeneización de la pasta.

Al igual que en el electrodo anterior, es este caso también se introdujeron por presión pequeñas porciones de la mezcla en cilindros de teflón huecos (3 mm de diámetro interno) provistos de un tornillo de acero inoxidable que actúa de contacto eléctrico. Finalmente, las partes sobrantes del material compuesto se eliminaron y la superficie del electrodo se pulió sobre papel no abrasivo con el fin de asegurar una buena conductividad y obtener una superficie reproducible y uniforme.

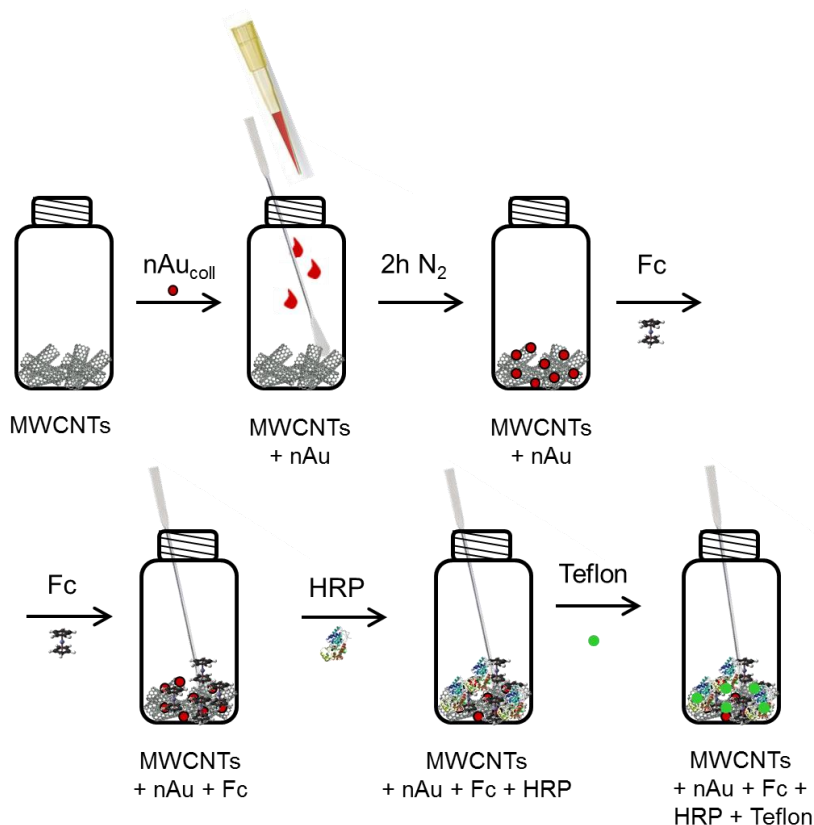


Figura 21.- Preparación de la mezcla compuesta para el biosensor de creatinina

Seguidamente se deposita una gota de 10 μL de la mezcla trienzimática (CA, 117 U/mg; CI, 12 U/mg y SO, 41 U/mg en 50 μL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4) sobre la superficie del electrodo, y se deja secar aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. A continuación se cubre dicha superficie con una porción de membrana de diálisis, previamente hidratada en agua desionizada, que se fija al electrodo con un anillo de goma (Figura 22). Una vez preparados los biosensores se dejan en un contenedor cerrado en ambiente húmedo a 4°C hasta su uso. En la Figura 23 se muestra un esquema del funcionamiento del biosensor.

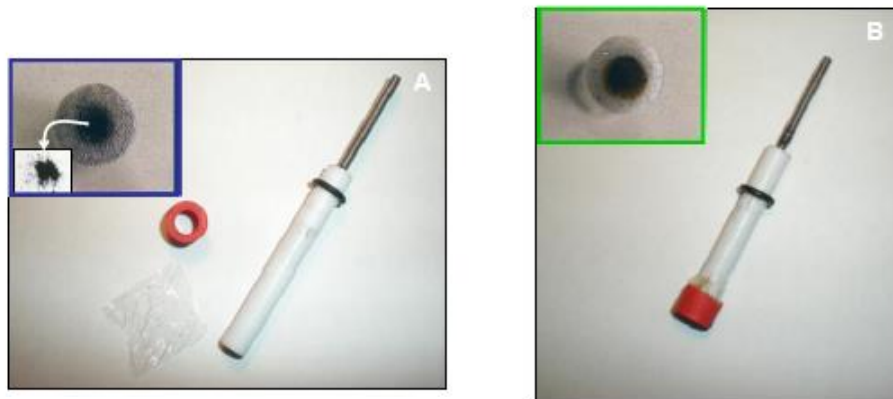


Figura 22.- Colocación de la membrana de diálisis

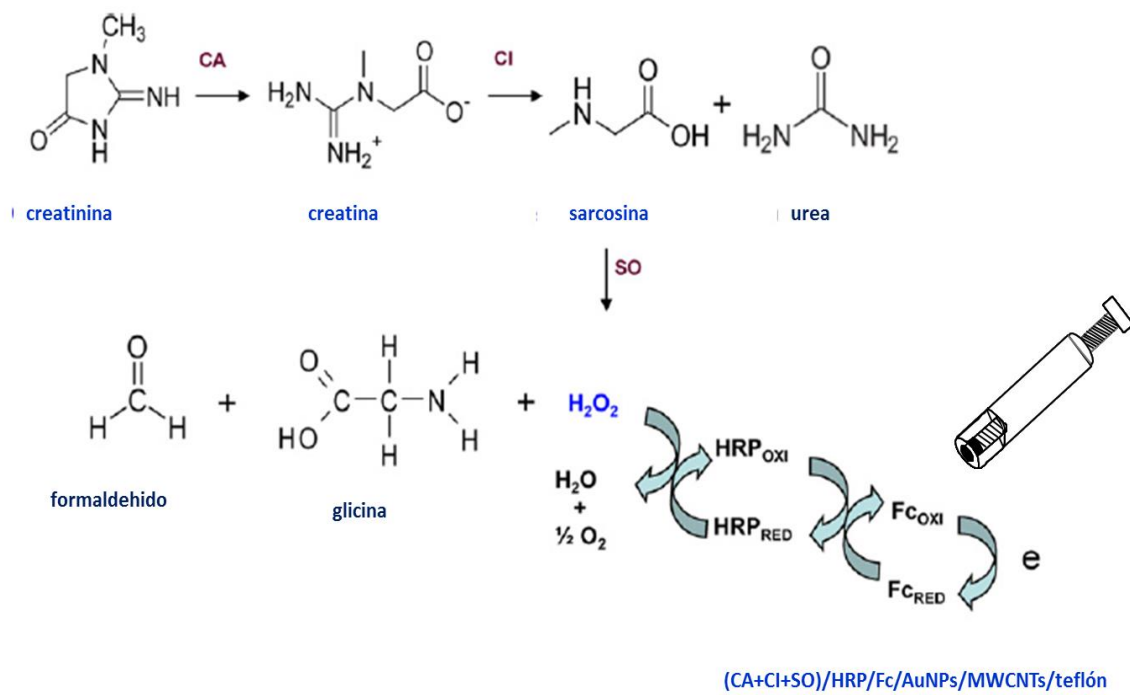


Figura 23.- Esquema del biosensor para la determinación de creatinina.

4.5.1.3. Biosensores de alcohol deshidrogenasa y de tirosinasa basados en electrodos modificados con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)

Tal como se observa en la Figura 24, en primer lugar se prepararon los electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de oro, añadiendo 15 μL de la suspensión de oro coloidal y dejando secar a temperatura ambiente en ausencia de luz. Una vez lavados por inmersión con agitación en agua desionizada durante treinta segundos, se depositó sobre cada AuNPs/SPCE una gota de 40 μL de disolución de EDOT 0.03 M conteniendo 2.25 U/ μL de ADH ó 2.5 U/ μL de TYR en el líquido iónico BMIMPF₆ y, a continuación, se aplicó un potencial de + 600 mV (ADH) ó + 200 mV (TYR) durante 5 minutos. En la Figura 24 se han representado también los esquemas de funcionamiento de los biosensores de ADH y TYR.

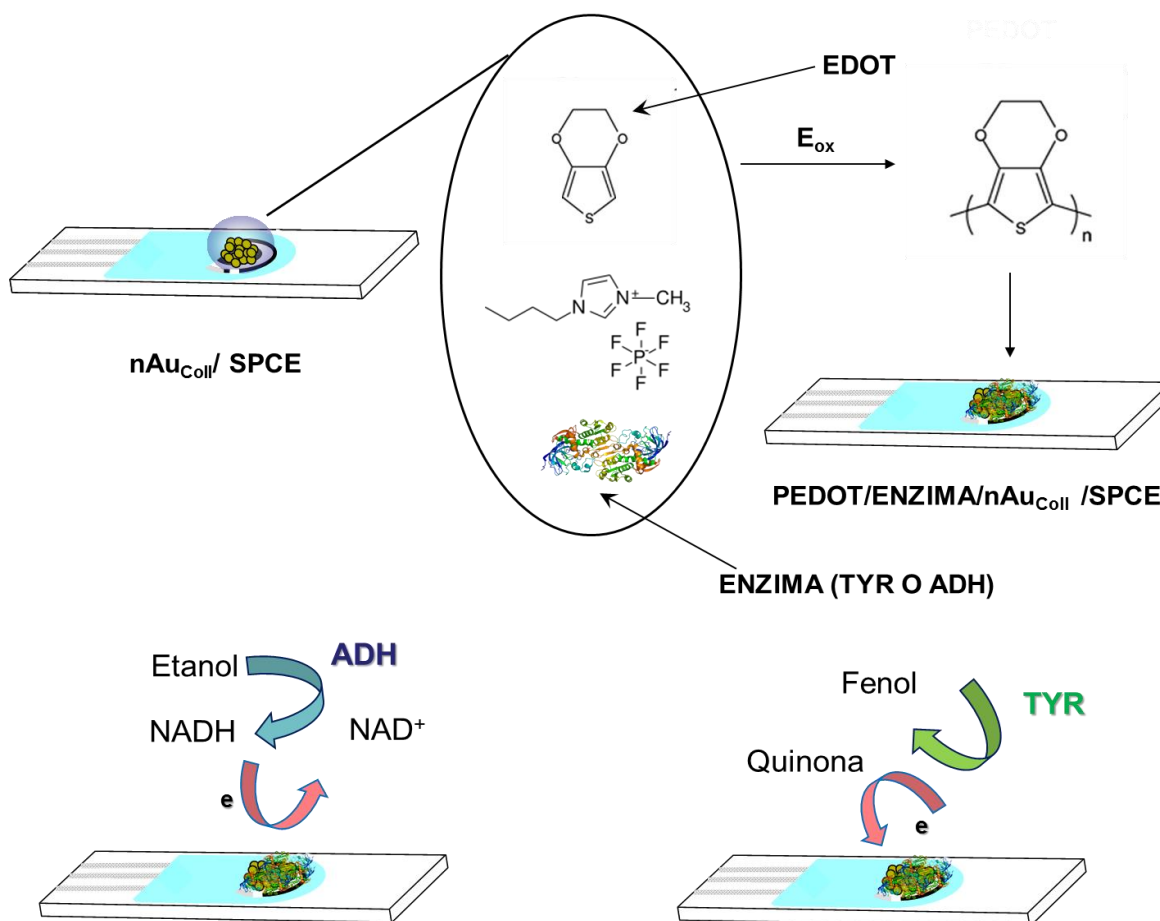


Figura 24.- Preparación y funcionamiento de los biosensores de ADH y de TYR basados en electrodos modificados con PEDOT

4.5.2. Preparación de los inmunosensores

4.5.2.1. *Inmunosensor sin marcador para la determinación simultánea de hormona del crecimiento humana (hGH) y prolactina (PRL).*

En la Figura 25 se ha representado el esquema de la preparación y el funcionamiento de este inmunosensor. El diseño está basado en el empleo de electrodos serigrafiados de carbono en configuración dual, previamente modificados con nanotubos de carbono, nanopartículas de poli(etilendioxitiofeno) (PEDOT) y nanopartículas de oro. En primer lugar, sobre cada superficie activa del electrodo se depositaron 0.7 μL de una suspensión de 0.5 mg/mL de nanotubos de carbono en dimetilformamida, previamente carboxilados en medio ácido. El disolvente se evaporó mediante aplicación de calor con una lámpara infrarroja y, a continuación, se añadieron 0.7 μL de una suspensión de nanopartículas de PEDOT al 1 %, dejando secar a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez lavados con agua desionizada, los electrodos PEDOT/MWCNTs/SPCE se sumergieron en 1 mL de disolución de oro coloidal durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, los AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCEs se lavaron con disolución reguladora Tris 0.1 M + Tween 20 al 0.05 % de pH 7.2.

Para la preparación del inmunosensor dual se depositaron, respectivamente, 3 μL de disolución de anti-hGH y de anti-PRL de 30 $\mu\text{g/mL}$ cada una de ellas, en los electrodos AuNPs/PEDOT/MWCNT/SPCE₁ y AuNPs/PEDOT/MWCNT/SPCE₂, incubando durante 14 horas a 4 °C en ambiente húmedo. Transcurrido este tiempo y después de haber lavado los electrodos como se ha descrito anteriormente, se sumergieron durante 30 minutos en 1 mL de disolución bloqueante de BSA al 0.25 % a temperatura ambiente en la oscuridad y, tras ser lavados nuevamente, se depositaron 3 μL de hGH (o la muestra) sobre el electrodo anti-hGH-AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE₁ y otros 3 μL de PRL (o la muestra) sobre el electrodo anti-PRL-AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE₂, dejando incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de humedad controlada.

La determinación simultánea de hGH y PRL se realizó por inmersión del inmunosensor dual en una disolución de dopamina 0.5 mM en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4 y medida mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) entre -250 y + 600 mV antes y después de la incubación del antígeno. Entre ambas medidas, el electrodo se lavó en la misma disolución reguladora y se realizaron tres barridos consecutivos en ausencia de dopamina mediante voltamperometría cíclica (CV) entre -200 y + 500 mV con el fin de limpiar la superficie del inmunosensor.

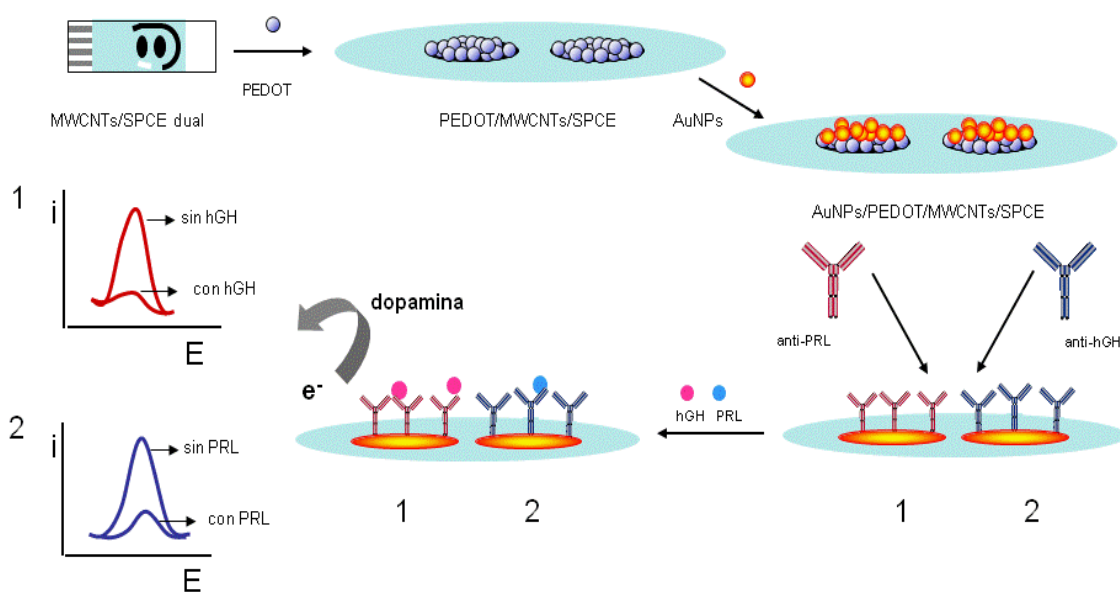


Figura 25.- Inmunosensor sin marcador para la determinación de hGH y PRL.

4.5.2.2. *Magnetoinmunosensor para la determinación de hormona del crecimiento (hGH)*

La Figura 26 muestra un esquema de la preparación y el funcionamiento de este inmunosensor. En primer lugar se preparó en conjugado mAbhGH-TsMBs. Para ello, se transfirieron 33 μL de la suspensión de TsMBs a un tubo eppendorf que se colocó en un separador magnético durante dos minutos, eliminando el sobrenadante con ayuda de un imán. Después, las micropartículas se lavaron con 1 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4. Cada etapa de lavado consistió en la resuspensión de las TsMBs en la disolución correspondiente, agitando vigorosamente durante un minuto, seguido de la separación del sobrenadante una vez colocado el eppendorf en el separador magnético durante tres minutos. A continuación se añadieron 20 μL de disolución de mAbhGH de 1 mg/mL, 10 μL de la disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4 y 20 μL de una disolución de sulfato amónico 3 M, dejando incubar el conjugado mAbhGH-TsMBs durante 18 h a 37 °C con agitación a 400 rpm en un agitador-incubador. Transcurrido este tiempo, se aplicó una etapa de bloqueo, colocando el tubo en el separador de partículas magnéticas durante 2 minutos, retirando el sobrenadante y añadiendo 1 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4 + 0.5% BSA y dejándolo incubar 1 hora a 37° C con agitación a 600 rpm. Después, las mAbhGH-TsMBs se preconcentraron con ayuda del separador magnético, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4, homogeneizando la mezcla por agitación en un vortex durante 5 – 10 segundos. Tras colocar el eppendorf en el separador de partículas durante 2 minutos y extraer nuevamente el sobrenadante, el conjugado mAbhGH-TsMBs se resuspendió finalmente en 48 μL de regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4 conteniendo NaCl 0.1 M + 0.1% BSA.

Para la preparación del inmunosensor se diseñó un esquema de inmunoensayo tipo "sandwich". Para ello, 3 μL de la suspensión de mAbhGH-TsMBs se lavaron dos veces con 100 μL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4 + 0.1% BSA y, una vez más, con disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4. Después se eliminó el sobrenadante según el protocolo descrito anteriormente y se añadieron 50 μL de hGH, dejando incubar a 37 °C con agitación a 600 rpm durante 1 hora. A continuación, el conjugado hGH- mAbhGH-TsMBs se lavó dos veces con regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4 y se añadieron 50 μL del anticuerpo secundario pAbhGH, incubándolo en esta ocasión durante 30 minutos a 37° C con agitación a

600 rpm. Seguidamente, se repitieron los procesos de lavado descritos en la etapa anterior y se añadieron 50 μL de AP-anti-IgG dejando incubar 45 minutos a 37° C con agitación a 600 rpm. Finalmente, el conjugado AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs se lavó y se conservó en regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4 a 4 °C.

Inmediatamente antes de la medida, se realizó un cambio de medio aplicando una etapa de lavado con Trizma + MgCl_2 0.1 M de pH 9.0 para, a continuación, resuspender el conjugado en 49 μL de esta disolución e inmovilizarlo sobre el SPAuE con ayuda de un imán. La determinación de hGH se realizó por adición de 1 μL de 4-APP 0.05 M y medida de la respuesta mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) entre - 0.6 y + 0.8 V después de un tiempo de espera de 2 minutos.

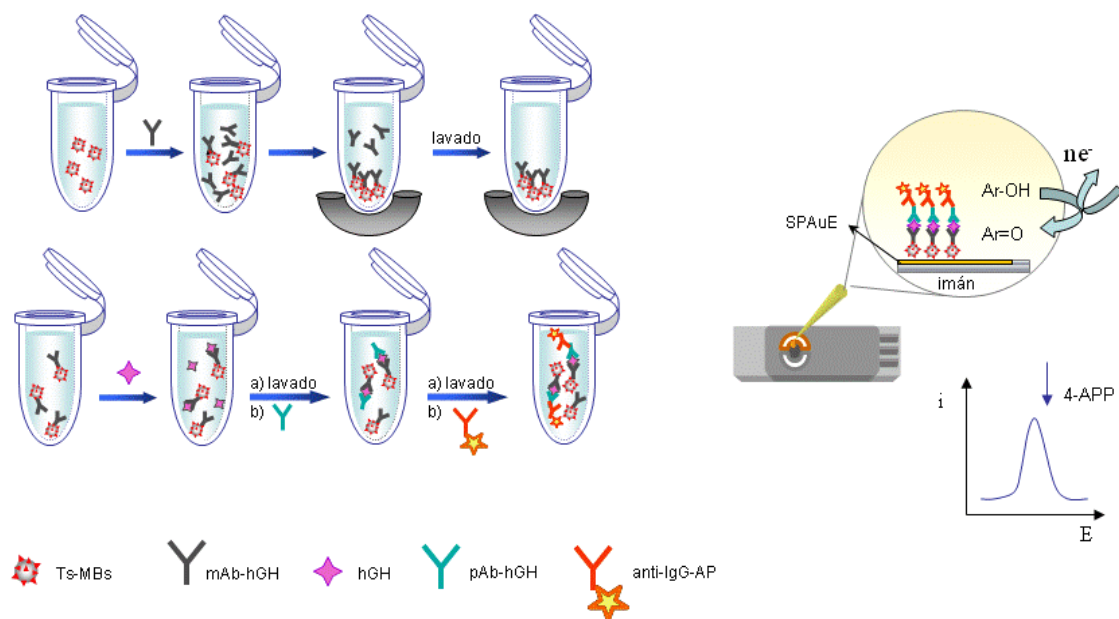


Figura 26.- Preparación y funcionamiento del magnetoimmunosensor para la determinación de hGH

4.5.2.3. Inmunosensor para la determinación de factor de crecimiento insulínico IGF1

El esquema de la preparación y funcionamiento del inmunosensor para la determinación de IGF1 se muestra en la Figura 27. Esta configuración se construyó sobre un electrodo de carbono vitrificado previamente modificado con nanotubos de carbono y ácido poli(pirrolpropiónico) (pPPA). Antes de la modificación de la superficie del electrodo se aplicó un pretratamiento de limpieza que consistió en pulir su superficie sobre una suspensión acuosa de alúmina de 0.3 μm de tamaño de grano durante un minuto, seguido de agitación ultrasónica durante 30 segundos con el electrodo sumergido, primero en agua desionizada y luego en acetona para, finalmente, dejarlo secar a temperatura ambiente.

Los electrodos modificados se prepararon depositando en primer lugar, sobre su superficie, 3 μL de una suspensión de nanotubos de carbono carboxilados, de 0.5 mg/mL, en dimetilformamida, dejando secar bajo radiación infrarroja. Después se generó electroquímicamente el polímero pPPA (ácido poli(pirrolpropiónico)) sobre el electrodo MWCNTs/GCE sumergiéndolo en una disolución de ácido pirrolpropiónico (PPA) 0.1 M en KCl 0.5 M, y aplicando barridos sucesivos mediante voltamperometría cíclica (30 ciclos) entre 0.0 y + 850 mV a 100 mV/s. Finalmente, el electrodo se lavó con disolución de fosfato 0.1 M + KCl 0.1 M de pH 4.5.

Para la preparación del inmunosensor, se depositaron 10 μL de una disolución de anti-IGF 1/100 en medio regulador fosfato 0.1 M + KCl 0.1 M de pH 4.5, dejándolo incubar durante 90 minutos a 25 °C en ambiente húmedo y en la oscuridad. Tras lavar el inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNT/GCE con la disolución de fosfato anterior, que usaremos en todas las etapas de incubación, se procedió a aplicar una etapa de bloqueo de la superficie electródica con 20 μL de BSA al 1%, dejando incubar 1 hora en ambiente húmedo. A continuación se estableció un diseño de inmunoensayo tipo "sandwich", mediante la deposición de 10 μL de disolución de IGF1 de la concentración deseada o la muestra en disolución reguladora PBS 0.1 M + KCl 0.1 M de pH 4.5, dejando incubar durante 3 horas a 25° C en ambiente húmedo. Después de lavar el inmunosensor con la misma disolución reguladora, se adicionaron

10 μL de HRP-anti IGF1 en dilución 1/100 y, después de 2 horas a 25 $^{\circ}\text{C}$ en ambiente húmedo, se lavó nuevamente la superficie del electrodo y se introdujo en una célula de medida que contenía disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4 y catecol 0.5 mM como mediador. La determinación de IGF1 se realizó por medida amperométrica de la respuesta a -50 mV en disoluciones agitadas tras la adición de peróxido de hidrógeno.

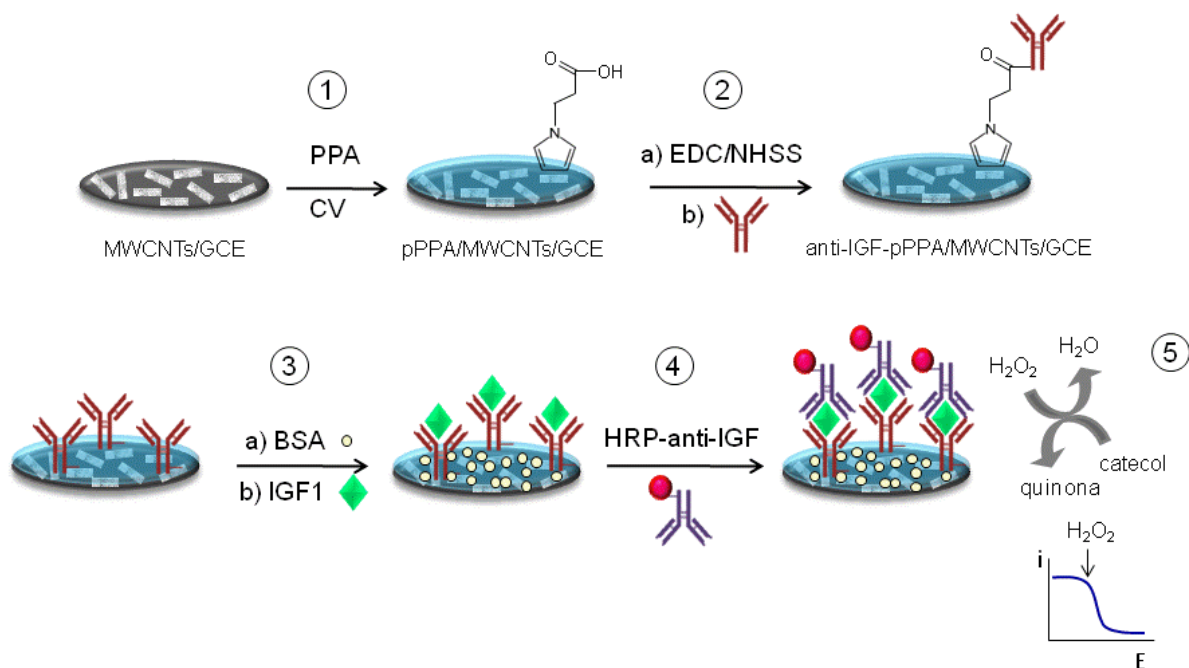


Figura 27.- Preparación y funcionamiento del inmunosensor para la determinación de IGF1

4.5.2.4. *Inmunosensor para la determinación de prolactina (PRL).*

La Figura 28 muestra el esquema de la preparación y el funcionamiento de este inmunosensor. Se trata de un diseño competitivo indirecto basado en el empleo de electrodos de carbono vitrificado modificados con MWCNTs y pPPA de acuerdo con el procedimiento anterior. Una vez preparado cada electrodo pPPA/MWCNTs/GCE, se aplicó una etapa de lavado con disolución reguladora Tris 0.1 M de pH 7.2 + 0.05% de Tween 20, y se procedió a inmovilizar el antígeno por deposición de 10 μ L de disolución de PRL de 40 μ g/mL en el medio regulador Tris 0.1 M pH 7.2, incubando durante 2 horas a 25 °C. Después, una vez lavado como anteriormente, se aplicó una etapa de bloqueo de la superficie electródica con 20 μ L de BSA al 0.005 %, incubando durante 1 hora a 25 °C. Al mismo tiempo, de forma paralela a esta preparación, se llevó a cabo la formación del conjugado AP-anti-PRL-PRL, mezclando en un tubo eppendorf 20 μ L de una disolución del anticuerpo marcado, en dilución 1/100, y la disolución de PRL en concentración variable o la muestra en Tris 0.1 M pH 7.2, dejándolo estar durante 30 minutos a 25 °C.

Tras lavar el electrodo, se depositó una gota de 10 μ L de dicho conjugado sobre la superficie del PRL-pPPA/MWCNTs/GCE incubándolo durante 2 horas a 25 °C, con el fin de enlazar a la proteína el exceso de anticuerpo marcado que no había reaccionado. Finalmente, la determinación de PRL se llevó a cabo sumergiendo el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE en 500 μ L de una disolución reguladora Trizma de pH 9.6 que contenía 1-naftilfosfato 5 mM, registrando después de 10 minutos, para que transcurra la reacción enzimática, los voltamperogramas en diferencial de impulsos entre -0.1 y 0.6 V.

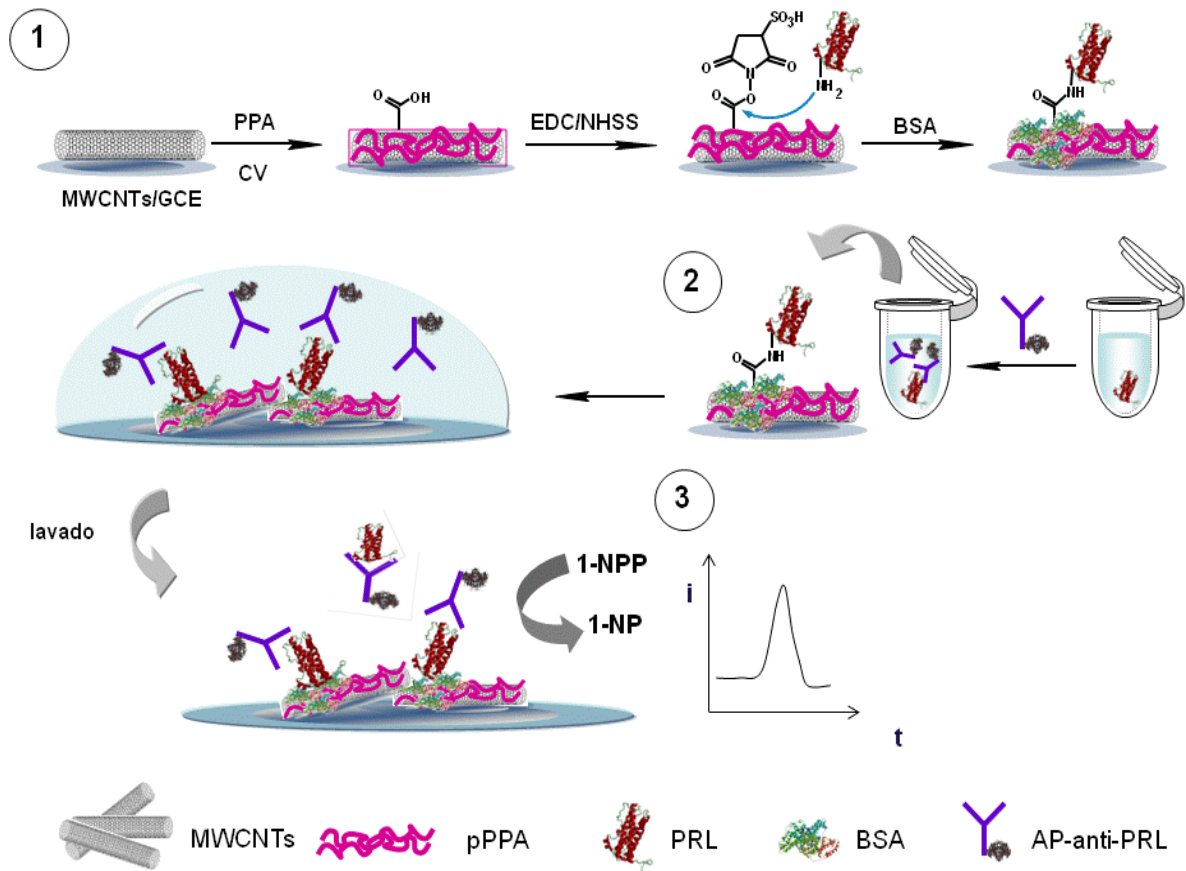


Figura 28.- Preparación y funcionamiento del inmunosensor para la determinación de PRL.

4.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS

4.6.1. Determinación del contenido total de glucosinolato en semillas de coles de Bruselas con el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón

Una cantidad aproximada de 0.3 g de muestra exactamente pesada, se trató en agua hirviendo durante 15 minutos con el fin de desactivar la enzima mirosinasa endógena del vegetal. Una vez aisladas las semillas, se trituraron en un mortero con 3-4 mL de agua hasta formar una pasta fina y homogénea. Esta pasta, suspendida en agua, se transfirió a un matraz de 10 mL, y se aplicó agitación ultrasónica durante 5 minutos. A continuación, el extracto de la muestra tratada se filtró a través de un filtro de Nylon de 0.45 μm , purificando y preconcentrando el filtrado mediante extracción en fase sólida (SPE). En esta etapa, se utilizaron de forma secuencial cartuchos Mega Bond Elut C18 (primero) y Mega bond Elut NH₂ previamente activados con metanol y lavados con agua y ácido acético 0.17 M, respectivamente. Sobre el cartucho de NH₂ que contenía los glucosinolatos, se hicieron pasar 3 mL de agua y se lavó con 10 mL de metanol. La extracción de los glucosinolatos se llevó a cabo con 10 mL de disolución de NH₃ al 1% de metanol. El extracto obtenido se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, disolviendo el residuo en 100 μL de regulador fosfato 0.05 M pH 7.4, y filtrándolo posteriormente a través de un filtro de jeringa (MFS, 0.50 μm de diámetro de poro).

La determinación se llevó a cabo en medio regulador fosfato 0.05 M de pH 7.4 mediante amperometría en disolución agitada, por medida de la respuesta de oxidación del peróxido de hidrógeno a un potencial de +500 mV vs Ag/AgCl, aplicando el método de adiciones estándar por adiciones sucesivas de una disolución patrón de sinigrin 2.0×10^{-4} M.

4.6.2. Determinación de creatinina en suero humano con el biosensor (CA-CI-SO)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón

Para el análisis de las muestras de suero humano certificado, que contenían 68.7 ± 1.4 μM de creatinina, se empleó el método de adiciones estándar, añadiendo cada vez 15 μL de creatinina 5 mM en medio regulador fosfato 1 M de pH 7.4, y midiendo la corriente de oxidación por amperometría en disolución agitada, a un potencial de 0.0 V vs Ag/AgCl. Para la determinación de creatinina en el suero enriquecido, las respuestas amperométricas obtenidas en las mismas condiciones se interpolaron en el tramo recto del calibrado de patrones.

4.6.3. Determinación de etanol en cerveza con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE

Las muestras de cerveza con bajo contenido en alcohol ($\leq 1\%$ vol. etanol) y las de cerveza certificada (0.505 % etanol) se desgasificaron durante 20 minutos y se diluyeron antes de proceder a su análisis (20 μL de cerveza comercial ó 40 μL de cerveza certificada en 10 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4). La determinación de etanol se realizó aplicando el método de adiciones estándar añadiendo alícuotas de una disolución patrón de etanol 0.05 M, midiendo la respuesta de oxidación por amperometría a +300 mV en disoluciones agitadas de regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4.

4.6.4. Determinación simultánea de hGH y PRL en suero y en saliva con el inmunosensor dual anti-hGH-AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE₁ y anti-PRL-AuNPs/ PEDOT/MWCNTs/SPCE₂

Las muestras de suero humano liofilizado, contaminado con hGH y PRL a diferentes niveles de concentración, se reconstituyeron en 1.0 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4, diluyendo posteriormente alícuotas de 2 μL de la muestra a 100 μL con regulador Tris 0.1 M de pH 7.2. La determinación de ambas hormonas se llevó a cabo mediante voltamperometría diferencial de impulsos sobre alícuotas de 3 μL del suero diluido en cada electrodo, considerando la disminución de las respuestas de oxidación de las disoluciones de dopamina 0.5 mM en regulador Tris 0.1 M de pH 7.2 mediante DPV para cada electrodo, antes y después de la reacción antígeno-anticuerpo, e interpolando esta diferencia en el intervalo recto del correspondiente calibrado de patrones de hGH y PRL.

Las muestras de saliva se recogieron empleando un dispositivo de recolección Salivette. Para ello, el voluntario se enjuagó cada vez la boca con agua abundante, introduciéndose a continuación la torunda de algodón en la misma, y masticándola durante un minuto. Después, el algodón saturado de saliva se insertó en el vial del dispositivo, se cerró la tapa y se centrifugó durante cinco minutos a 5000 rpm. Finalmente, la determinación de hGH y PRL se realizó aplicando el procedimiento anterior a 1 mL de saliva enriquecida diluida en 1 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.2.

4.6.5. Determinación de hGH en suero humano con el magnetoinmunsensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs

La muestra analizada fue un suero liofilizado enriquecido con hGH a dos niveles de concentración, 4.0 y 0.1 ng/mL. Una vez reconstituido en 1 mL de regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4, la determinación de hGH se llevó a cabo sobre una gota de 50 μ L que contenía la suspensión del conjugado AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs y 1 μ L de 4-APP 0.05 M en medio regulador Trizma de pH 9.0. Después de 2 minutos de reacción, la respuesta del 4-aminonaftol generado en la reacción enzimática se monitorizó sobre un electrodo SPAuE mediante voltamperometría de onda cuadrada entre - 600 y + 800 mV.

4.6.6. Determinación de IGF1 en suero humano con el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE

El suero humano liofilizado se reconstituyó en 1.0 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4 agitando hasta su completa disolución. A continuación se enriqueció con IGF1 a distintos niveles de concentración comprendidos entre 0.01 y 10.0 ng/mL, aplicándose dos procedimientos de análisis. Por un lado, la muestra enriquecida se analizó directamente y, por otro, se utilizó un método adecuado para liberar la hormona de las proteínas transportadoras, tratando la muestra mediante agitación suave en medio etanol ácido. En este caso, la suspensión resultante se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se filtró a través de filtros de nylon de 0.5 μ m de tamaño de poro llevando a cabo una dilución del filtrado (100 μ L) con 200 μ L de disolución de fosfato 0.1 M de pH 4.5.

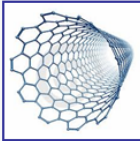
La determinación de IGF1 se realizó sobre alícuotas de 10 μ L de disolución de la muestra por adición de peróxido de hidrógeno, mediante amperometría en disoluciones agitadas que contenían catecol 0.5 mM en regulador fosfato 0.1 M de pH 4.5 a -50 mV.

4.6.7. Determinación de PRL en muestras de suero y orina con el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE

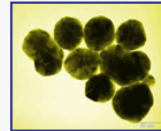
Se llevó a cabo la determinación de PRL en muestras de suero humano liofilizado enriquecido, reconstituído en 1 mL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.2. Para ello, el inmunosensor se sumergió en 500 μ L de una disolución de Trizma 50 mM de pH 9.6 conteniendo 1-NPP 5 mM y, tras dejar desarrollar la reacción enzimática durante 10 minutos, el producto generado se monitorizó por medida de la respuesta mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) entre -100 y $+600$ mV. Las corrientes de pico obtenidas se interpolaron en el tramo lineal del calibrado de patrones. Por otro lado, se analizaron también muestras de orina (Liquichek Urine Chemistry Control, Level 1. BioRad 63221), enriquecidas igualmente con PRL a varios niveles de concentración. En este caso, antes de la aplicación del procedimiento anterior, fue necesario filtrar las muestras, así como ajustar el pH a 7.4 (el pH original es 5.0) con NaOH 2 M para evitar la desnaturalización de alguno de los biocomponentes durante las etapas de incubación.

5

Resultados y Discusión



**5.1. BIOSENSORES BASADOS EN MATERIALES
HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y
NANOPARTÍCULAS DE ORO**



5.1.1. Biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolato

Como ya se ha indicado en la Introducción de esta Memoria, los glucosinolatos son compuestos naturales presentes en los vegetales de la familia de las *Brassica Cruciferae*, entre los que se encuentran el brécol, las coles de Bruselas, la calabaza y la coliflor [Fahey, 2001]. Como también se ha señalado, entre las propiedades de estas especies destaca una posible actividad protectora contra el cáncer, si bien esta acción saludable se opone al efecto adverso que origina un consumo excesivo de vegetales ricos en glucosinolatos, debido a la acción nociva de sus productos de hidrólisis.

Se ha visto también, en la parte de Antecedentes, que entre los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de estos compuestos, únicamente existe uno que pueda considerarse basado en un biosensor enzimático propiamente dicho. En él se mide la respuesta amperométrica de un electrodo de oxígeno sobre el que se inmovilizan las enzimas mirosinasa (MYR) y glucosa oxidasa (GOx) con ayuda de una membrana de cáscara de huevo [Wu, 2005].

En este trabajo se ha desarrollado un biosensor para la determinación de glucosinolatos basado en la incorporación de las mismas enzimas: MYR y GOx a la matriz compósita formada por una mezcla de nanopartículas de oro (AuNPs), nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y teflón. Como se verá, las características analíticas del método desarrollado son adecuadas para llevar a cabo esta determinación en muestras reales, mejorando notablemente las de los métodos enzimáticos existentes.

5.1.1.1. *Preparación del biosensor*

En la Parte Experimental (Apdo. 4.5.1.1) se ha descrito el procedimiento utilizado para la preparación del biomaterial electródico y se ha representado esquemáticamente la secuencia de reacciones en que se basa el funcionamiento del biosensor. Brevemente, como ya se ha señalado, la enzima MYR cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos formando glucosa que, en una segunda etapa, se oxida en presencia de GOx, originando peróxido de hidrógeno que se detecta amperométricamente.

5.1.1.2. *Optimización de las variables experimentales*

En un trabajo anterior [Manso, 2007], se optimizaron las condiciones de fabricación de la mezcla GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón para la preparación de un biosensor de glucosa. Según aparece descrito en el Apdo 4.5.1.1 de la Parte Experimental, el procedimiento consistió, resumidamente, en la agitación manual durante 10 min, de 50 mg de MWCNTs y 360 μ L de la suspensión de oro coloidal, incorporando seguidamente 1 mg de GOx a la pasta, una vez homogeneizada y seca, y 50 mg de teflón. En este trabajo, partiendo de dichas condiciones, se optimizó la fabricación del material bienzimático por adición de mirosinasa. Para ello, se prepararon distintos electrodos, que se emplearon para medir disoluciones de un glucosinolato modelo, el compuesto denominado sinigrín que, como se ha señalado, es el más abundante en la muestra a analizar (semillas de coles de Bruselas), además de tratarse de un producto disponible comercialmente.

-Influencia de la cantidad de MYR

Para optimizar la cantidad de mirosinasa, se prepararon diferentes biosensores MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón siguiendo el procedimiento anterior, empleando pastas fabricadas con 10, 20 ó 40 mg de enzima, equivalentes a 3.6, 7.2 y 14.4 unidades, y 50 mg de

teflón. Con ellos se midieron las respuestas amperométricas de disoluciones de sinigrín en el intervalo de concentraciones comprendido entre 2.0×10^{-5} y 1.0×10^{-3} M en medio regulador fosfato 0.05 M de pH 7.4. Los resultados obtenidos en este estudio se han representado en la Figura 29.

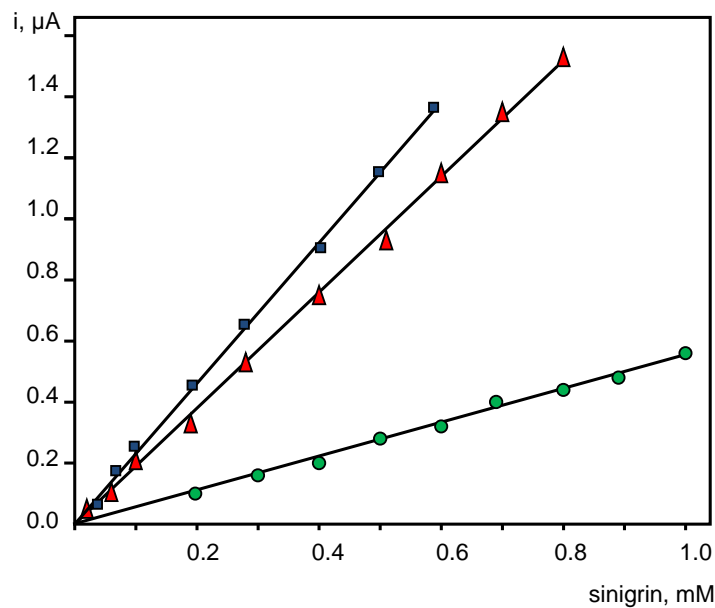


Figura 29.- Calibrados para sinigrín sobre el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón. MYR: 14.4 U (azul), 7.2 U (rojo), 3.6 U (verde). $E_{ap} = +500$ mV vs. Ag/AgCl.

Como puede apreciarse, la pendiente de los calibrados obtenidos aumenta con la cantidad de MYR, si bien dicho aumento viene acompañado de un acortamiento del intervalo lineal, según se observa claramente cuando se emplean 14.4 U de enzima. Teniendo en cuenta estos resultados, así como la pequeña diferencia de pendientes entre las configuraciones preparadas con 14.4 y 7.2 U de MYR, se eligió esta última cantidad para la preparación del biosensor bienzimático.

En la Figura 30 se muestra, a modo de resumen, un esquema que representa todas las etapas de preparación del biosensor bienzimático.

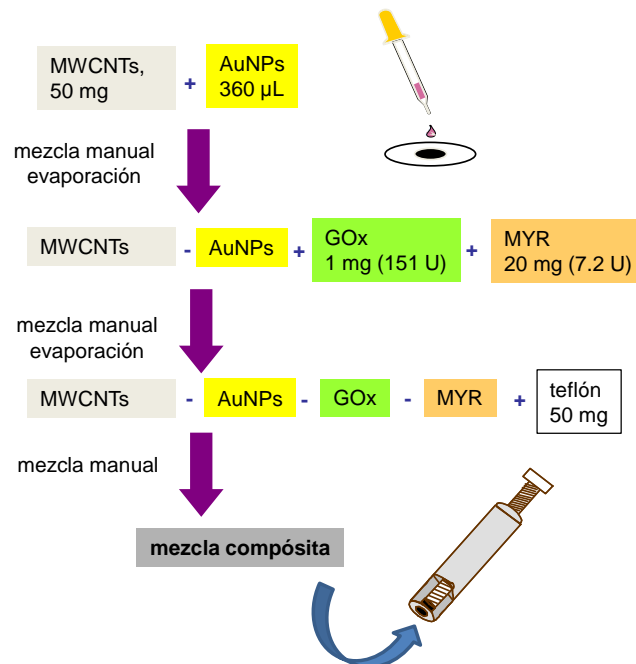


Figura 30.- Esquema de las etapas de preparación del biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolatos

5.1.1.3. Calibrados y características analíticas

Las características analíticas del método desarrollado para la determinación del glucosinolato sinigrín con el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón se han resumido en la Tabla 17, comparándose con las obtenidas empleando un biosensor equivalente preparado en ausencia de nanopartículas de oro. Como puede apreciarse, la presencia de estas partículas mejora notablemente la amplitud del intervalo lineal, que se extiende desde una concentración 0.02 mM de sinigrín, diez veces inferior a la obtenida con el biosensor MYR/GOx/MWCNTs/teflón. Además, esta configuración también ofrece una mayor sensibilidad, siendo la pendiente del calibrado obtenido más de tres veces superior en presencia de las nanopartículas de oro, lo que se debe probablemente a la capacidad de las mismas de mejorar la cinética de oxidación del peróxido de hidrógeno sobre el biosensor. Esta diferencia de sensibilidad se pone también de manifiesto en los valores de los límites de detección, calculados con el criterio de $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado y s_b es la desviación estándar de las medidas de corriente en estado estacionario ($n=10$) para la concentración de sinigrín más

baja de dicho calibrado, 0.02 mM. Como puede observarse, el límite de detección cuando se emplea el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón es más de diez veces inferior al obtenido con el otro biosensor.

Tabla 17.- Características analíticas del método para la determinación de sinigrín

Características	MYR/GOx/AuNPs/ MWCNTs/teflón	MYR/GOx/ MWCNTs/Teflón
Intervalo lineal, mM	0.02 – 1.0	0.2 – 1.0
Pendiente, mA/M	1.89 ± 0.04	0.58 ± 0.04
Límite de detección, μ M	5.9	67
Límite de cuantificación, μ M	20	190
RSD, % (n= 5)	3.2	4.5

Las características analíticas del método desarrollado en este trabajo también son mejores que las de otras configuraciones descritas en la bibliografía. Por ejemplo, el intervalo lineal es más amplio que el obtenido con el biosensor citado anteriormente [Wu, 2005]. Por otro lado, también se encontró una mayor sensibilidad que la obtenida empleando un sistema de detección amperométrica mediante inyección en flujo con un reactor empaquetado de MYR, y con GOx inmovilizada sobre un electrodo de platino, a pesar de utilizar un potencial 150 mV menos positivo con el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón [Tsiafoulis, 2003].

5.1.1.4. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Una de las ventajas de los electrodos compósitos que emplean de teflón como aglutinante es su elevada estabilidad [Carralero, 2006]. Con el fin de comprobar esta característica, así como también el efecto sobre la misma de la presencia de las nanopartículas de oro en la matriz del biosensor, en este trabajo se realizaron diferentes estudios de reproducibilidad y estabilidad. En primer lugar se obtuvieron cinco calibrados sucesivos de sinigrín en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.2 y 1.0 mM utilizando un mismo biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón. Una vez calculados los valores de las pendientes de dichos calibrados, se encontró entre ellos una desviación estándar relativa, RSD = 3.2% (n=5). Este resultado, que aparece indicado en la Tabla 17, pone de manifiesto la buena repetibilidad de las medidas amperométricas. Además, con fines comparativos, este mismo estudio se realizó empleando un biosensor preparado en ausencia de nanopartículas de oro, encontrándose un valor de RSD = 4.5% (n=5) entre las pendientes, que es ligeramente superior al anterior.

En otro estudio independiente del anterior, se prepararon cinco biosensores MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón diferentes, con los que se midieron, en distintos días, cinco disoluciones de sinigrín de concentración 2.0×10^{-4} M. En este caso, el valor de la desviación estándar relativa de las medidas amperométricas, fue RSD = 6.5% (n=5), resultado que demuestra la buena reproducibilidad del método de preparación de los bioelectrodos. Por otro lado, con el fin de evaluar el tiempo de vida útil, se utilizó un único biosensor para realizar cada día tres medidas de una disolución de sinigrín de concentración 6.0×10^{-4} M, almacenándose seguidamente, cada vez, a -18 °C. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 31, en la que se muestran los límites de $\pm 3s$, donde s es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de uso del biosensor. Como puede observarse, a partir del séptimo día, los valores medios de las corrientes comenzaron a decaer, si bien permanecieron dentro de los límites indicados durante un total de nueve días sin necesidad de aplicar ningún tratamiento de regeneración de la superficie del biosensor. A partir de ese momento, podría recuperarse la señal sin más que pulir la superficie del electrodo sobre un papel no abrasivo. Hay que destacar

que este periodo de vida es superior al encontrado para un bioelectrodo equivalente preparado en ausencia de nanopartículas de oro (cuatro días). La diferencia encontrada puede atribuirse a la demostrada capacidad de estas nanopartículas de adsorber proteínas manteniendo su actividad biológica.

Finalmente, se estudió la estabilidad de almacenamiento de la matriz biocompósita MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón. Para ello, una vez preparada, se mantuvo en seco a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, observándose que los biosensores preparados a partir de ella proporcionaban durante al menos dos meses, señales amperométricas que no diferían significativamente de la respuesta obtenida a partir de una mezcla recientemente preparada. Este resultado demostró nuevamente la elevada estabilidad de la mezcla compósita fabricada para la construcción del biosensor.

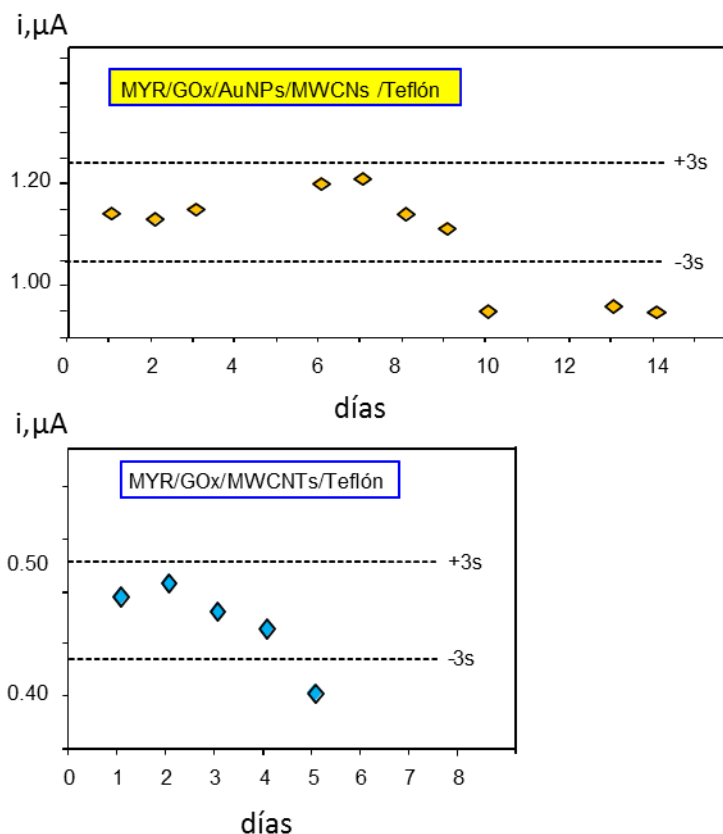


Figura 31.- Gráficos de control para evaluar la estabilidad de los biosensores MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón (superior) y MYR/GOx/ MWCNTs/teflón (inferior). Sinigrín, $6.0 \times 10^{-4}\text{ M}$; $E_{\text{det}} = 500\text{ mV}$.

5.1.1.5. Parámetros cinéticos

En primer lugar se comprobó que la reacción enzimática global en el biosensor obedece a una cinética del tipo de Michaelis-Menten, calculando el parámetro x de la ecuación de Hill, que viene dada por:

$$\log \left[\left(\frac{i_{\max}}{i} - 1 \right) \right] = \log K_M^{ap} - x \log[S]$$

Para ello, se midieron disoluciones de sinigrín preparadas a concentraciones comprendidas entre 0.1 y 60 mM, con el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón en medio regulador fosfato 0.05 M de pH 7.4, obteniéndose la representación que aparece en la Figura 32A.

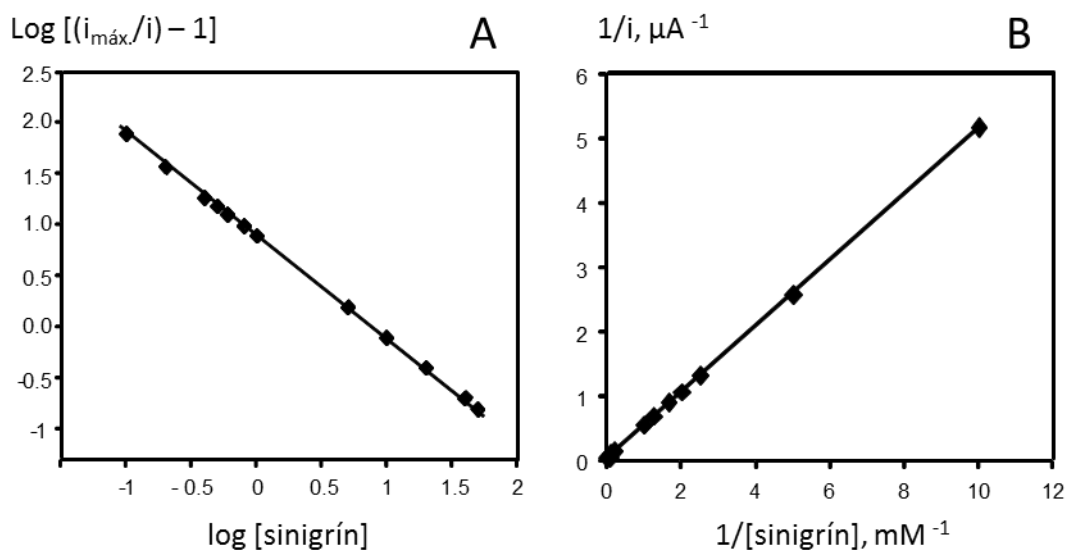


Figura 32.- Representaciones de Hill (A) y Lineweaver-Burk (B) para los datos amperométricos obtenidos con el biosensor MYR/GOx/MWCNTs/teflón

Como puede observarse, dicha representación es la de una línea recta ($r = 0.999$), cuya pendiente, calculada a partir de los datos experimentales utilizados para construir la gráfica, resultó ser igual a 1.02 ± 0.03 . Este resultado demuestra el buen ajuste al modelo cinético esperado. Una vez puesto de manifiesto este comportamiento, hay que tener en cuenta que el biosensor desarrollado en este trabajo se basa en la acción de dos enzimas que catalizan secuencialmente la hidrólisis del sinigrín y la oxidación de la glucosa formada en la primera

reacción. En el cálculo de los parámetros cinéticos se ha supuesto que la reacción catalizada por la mirosinasa es la más lenta, siendo entonces ésta la etapa limitante del proceso global, de modo que la respuesta del biosensor viene controlada por la velocidad de la misma.

Para calcular la constante de Michaelis-Menten, se utilizó el método de Lineweaver-Burk, representando los valores de la inversa de la corriente obtenida para diferentes concentraciones de sinigrin, en el intervalo citado anteriormente y en las mismas condiciones experimentales, frente a la inversa de cada concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32b. La ecuación representada tiene la forma:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M^{ap}}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

donde V_{\max} simboliza la respuesta del biosensor en la región de saturación, y K_M^{ap} es la constante aparente buscada. Los resultados obtenidos fueron (n=3):

$$V_{\max} = 15.4 \pm 0.5 \mu\text{A}$$

$$K_M^{ap} = 7.9 \pm 0.6 \text{ mM}$$

Como es sabido, desde un punto de vista analítico, cuanto más alta es la constante, menor es la sensibilidad del método, pero mayor es el intervalo de linealidad del calibrado. En el caso del biosensor desarrollado, el valor calculado pone de manifiesto una buena actividad enzimática, comparable a la que se ha obtenido en algunos estudios anteriores para la enzima mirosinasa frente al mismo sustrato. Por ejemplo, la constante de Michaelis-Menten calculada para esta enzima inmovilizada sobre un gel de poli(galactunorato) cálcico fue $6.28 \pm 0.09 \text{ mM}$ [Braschi, 2011]. También se ha reportado un valor medio de $K_M^{ap} = 8.1 \text{ mM}$ para la enzima inmovilizada en distintos tipos de suelos [Al-Turki, 2003]. Por otra parte, todos estos resultados son notablemente superiores a los obtenidos para la mirosinasa en disolución, $0.96 \pm 0.01 \text{ mM}$ [Braschi, 2011], debido probablemente a los cambios conformacionales que se producen como consecuencia de la inmovilización, y que pueden afectar al sitio activo de la enzima.

5.1.1.6. Estudios de selectividad

Según se ha indicado, los glucosinolatos son responsables del sabor y aroma de diversos alimentos, atribuyéndose a sus productos de degradación cierta actividad protectora frente a agentes patógenos. Debido a sus propiedades, estas especies juegan un importante papel en la industria alimentaria y en medicina, encontrándose en distintos tipos de matrices en las que pueden coexistir con otros compuestos. Por ello, con el fin de evaluar la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de muestras reales, se investigó la influencia que sobre la respuesta del biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón ejercen otras especies que pueden aparecer en ellas conjuntamente con el glucosinolato. Los compuestos estudiados fueron las sales iónicas NaCl y CaCl₂, los ácidos orgánicos acético, málico, tartárico, succínico y oxálico, los aminoácidos glutámico, glicina y cisteína, y los productos de degradación del glucosinolato, alilisotiocianato y fenetilisotiocianato. Los resultados obtenidos por adición de cada una de las especies ensayadas en concentración 2.0×10^{-4} M sobre disoluciones de sinigrín de la misma concentración, pusieron de manifiesto que, tal como se muestra en la Figura 33, ninguna de ellas, a excepción de la cisteína, proporcionaba señales amperométricas en las condiciones experimentales de medida. En el caso de este aminoácido, la intensa corriente obtenida sobre el biosensor puede atribuirse a la oxidación del grupo tiol sobre la superficie del electrodo modificado con nanopartículas de oro. Esta propiedad había sido aprovechada en un trabajo anterior para poner a punto un método para la determinación de homocisteína sobre un electrodo de pasta de carbono [Agüí, 2007]. Hay que señalar que, sin embargo, esta interferencia no afectaría a la determinación de glucosinolatos en muestras reales, ya que como se verá, el pretratamiento empleado no es apropiado para la extracción de aminoácidos. En cuanto al efecto de los productos de degradación, alilisotiocianato y fenetil-isotiocianato, debido a su carácter aceitoso, ambos compuestos son muy poco solubles en el medio regulador fosfato utilizado, por lo que su presencia en las muestras tampoco afectaría a la respuesta del biosensor.

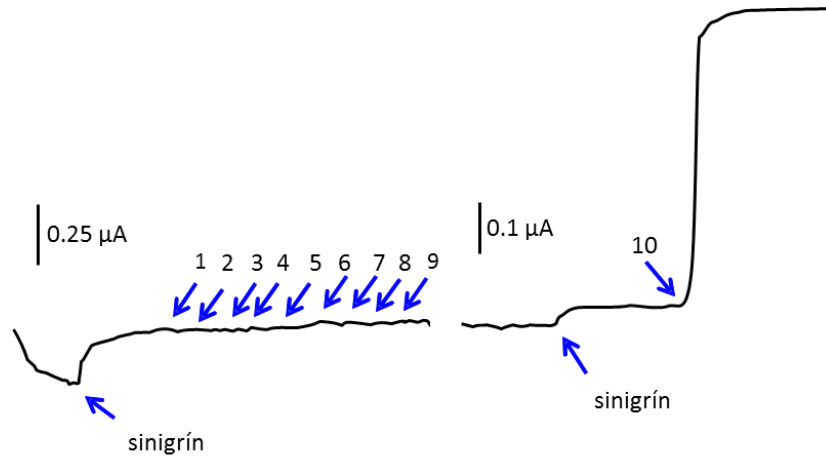


Figura 33.- Respuestas amperométricas obtenidas sobre el biosensor MYR/GOx/AuNPs/MWCNTs/teflón para disoluciones 2.0×10^{-4} M de NaCl (1); CaCl_2 (2); glicina (3), ácido glutámico (4), ácido málico (5), ácido oxálico (6); ácido succínico (7), ácido tartárico (8), ácido acético (9), y cisteína (10).

5.1.1.7. *Determinación de glucosinolatos en semillas de coles de Bruselas*

La utilidad del biosensor desarrollado se demostró por aplicación a una muestra con un contenido de glucosinolato relativamente alto, las semillas de coles de Bruselas. Este tipo de muestra había sido utilizada anteriormente para la validación de diversos métodos enzimáticos [Wu, 2005; Tsiafoulis, 2003] y cromatográficos mediante LC-MS/MS [Rochfort, 2006]. En los métodos enzimáticos basados en el sistema MYR/GOx, la determinación de glucosinolato se basa en la co-determinación de la glucosa libre presente en la muestra, calculando la concentración del analito por diferencia entre las señales debidas a la glucosa total y la glucosa libre [Wu, 2005; Tsiafoulis, 2003]. Sin embargo, este método puede dar lugar a errores, mientras que la interferencia de la glucosa puede evitarse si se aplica un tratamiento adecuado a la muestra. En este trabajo se aplicó un método de preparación adaptado del que aparece en la bibliografía para el análisis de semillas de brécol [Rochfort, 2006], con el fin de disminuir su complejidad y reducir el tiempo de análisis.

En la Figura 34 se ha representado esquemáticamente el procedimiento seguido. Como puede observarse, los extractos de semillas se purificaron empleando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) C₁₈ y de intercambio iónico, en forma de amina protonada, dispuestos en serie. Tal como se explica en el Apdo. 4.6.1 de la Parte experimental, cuando el extracto acuoso de la muestra se hace pasar a través del cartucho C₁₈, el material orgánico queda atrapado, mientras que el glucosinolato cargado pasa, reteniéndose posteriormente en el cartucho de amino protonado.

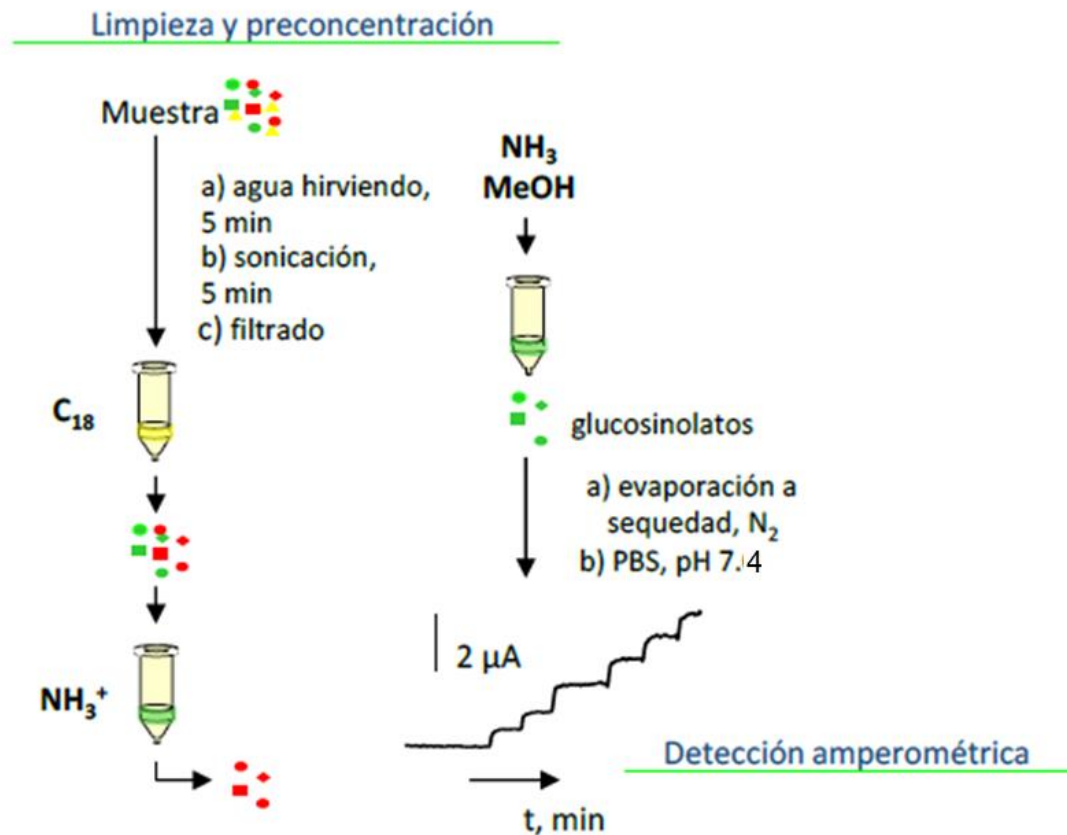


Figura 34.- Esquema del tratamiento de la muestra de semillas para la determinación de glucosinolatos

Una vez aplicado el tratamiento, la determinación de glucosinolatos se realizó mediante el método de adiciones estándar, por adiciones sucesivas de sinigrín en concentración 2.0×10^{-4} M sobre disoluciones que contenían el eluato de la muestra en regulador fosfato 0.05 M de pH 7.4. Los resultados obtenidos para el análisis de cinco muestras de semillas se han resumido en la Tabla 18. Como puede observarse, el valor medio encontrado resultó ser 0.68 ± 0.05 mM, para un nivel de significación de 0.05. Esta concentración de glucosinolatos es la media de las que contienen las disoluciones analíticas medidas una vez aplicado el tratamiento correspondiente, expresada como sinigrín. Por tanto, a partir de este resultado puede calcularse la concentración de glucosinolatos en las muestras analizadas teniendo en cuenta dicho

tratamiento. De este modo, el valor calculado fue de $22.7 \pm 1.7 \mu\text{mol/g}$. Con el fin de relacionar este dato con otros valores de concentración de glucosinolatos encontrados en trabajos anteriores, se revisó la bibliografía al respecto, encontrándose el margen de concentraciones comprendido entre 6.2 y 103 $\mu\text{mol/g}$ de glucosinolatos como el más frecuente en este tipo de muestras [Stancik, 1995], así como de 11.5 a 31.7 $\mu\text{mol/g}$ en distintas variedades de coles de Bruselas [Kushad, 1999]. Teniendo en cuenta estos valores, puede decirse que el método aplicado proporciona resultados que están de acuerdo con lo que cabe esperar en las muestras analizadas.

Con el fin de evaluar la exactitud del método, se llevaron a cabo estudios de recuperación, añadiendo concentraciones conocidas de sinigrín a las muestras de semillas. Tal como puede deducirse de los datos resumidos en la Tabla 18, los porcentajes de recuperación se situaron entre el 91.8 y el 100 % de glucosinolatos, lo que confirma la utilidad analítica del método basado en el biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolatos en este tipo de muestras.

Tabla 18.- Determinación de glucosinolatos en semillas de coles de Bruselas con el biosensor MYR/GOx-nAu/MWCNTs/teflón

Muestra	Sinigrín añadido, mM	Glucosinolato total, mM	Recuperación, %
1	-	0.70	98.9
	0.20	0.89	
2	-	0.74	100
	0.20	0.94	
3	-	0.63	97.6
	0.20	0.81	
4	-	0.65	91.8
	0.20	0.78	
5	-	0.69	97.8
	0.20	0.87	

5.1.1.8. Conclusiones

Como ponen de manifiesto los resultados obtenidos, materiales como los nanotubos de carbono y las nanopartículas de oro son capaces de crear un microambiente muy adecuado para la inmovilización efectiva de las enzimas mirosinasa y glucosa oxidasa. Esto ha hecho posible el desarrollo de un biosensor bienzimático para la determinación de glucosinolatos que mejora las características analíticas de otros métodos analíticos descritos en la bibliografía.

La utilidad del biosensor desarrollado ha quedado demostrada en el análisis de semillas de coles de Bruselas. La metodología empleada compite ventajosamente con otras más complejas y largas, lo que convierte a este biosensor en una atractiva herramienta para la industria alimentaria.

5.1.2. Biosensor multienzimático para la determinación de creatinina

Como se ha indicado en el Apdo. 3.2.3.2., la puesta a punto de métodos para la determinación sensible y selectiva de creatinina tiene un gran interés, debido a que su nivel en fluidos biológicos como suero y orina es un parámetro importante para la evaluación de ciertas disfunciones a nivel renal y muscular, principalmente. Por ello, se consideró la puesta a punto de un biosensor electroquímico enzimático para esta especie. Por otro lado, teniendo en cuenta el buen funcionamiento del electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/teflon, se utilizó esta plataforma como soporte para la inmovilización de las biomoléculas necesarias para la determinación.

Como se verá, el diseño multienzimático desarrollado en este trabajo se ha basado en el empleo de la matriz electródica anterior, a la que se le incorporan, además, las especies necesarias para la detección electroquímica, es decir, la enzima peroxidasa y el ferroceno empleado como mediador redox. Por otro lado, las enzimas necesarias para producir la cadena de reacciones de la creatinina: creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa, se inmovilizan en la superficie del electrodo. Esta estrategia ha hecho posible la preparación de un biosensor amperométrico con buenas características analíticas, destacando la alta sensibilidad, la estabilidad, y la rapidez de respuesta.

5.1.2.1. Preparación del biosensor

La secuencia de reacciones enzimáticas en las que se fundamenta el biosensor ha sido representada en la Figura 7 de la Introducción (Apartado 3.2.3.2). Brevemente, la creatinina es hidrolizada por la enzima creatinina amidohidrolasa (creatininasa, CA), formándose creatina que, en presencia de la enzima creatina amidinohidrolasa (creatinasa, CI), produce sarcosina. Finalmente, esta, en presencia de sarcosina oxidasa (SO), se transforma en glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno. Para la detección electroquímica, esta última especie es reducida en presencia de peroxidasa (HRP). Según se ha representado en la Figura 36, la regeneración de la forma reducida de la HRP mediada por el ferroceno (Fc) da lugar a la forma

oxidada del mediador (Fc^+) y, por último, la reducción electroquímica en la superficie del biosensor origina una señal amperométrica cuya magnitud es proporcional a la concentración de creatinina.



Figura 36.- Secuencia de reacciones que dan lugar a la respuesta electroquímica del biosensor

La preparación de esta configuración se realizó en dos etapas: en primer lugar, partiendo de las condiciones elegidas previamente para la fabricación del electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón, se optimizaron las variables experimentales que influyen en la respuesta del peróxido de hidrógeno sobre el biosensor de peroxidasa, incluyendo la enzima y el mediador en el material compósito. Después, se optimizó la inmovilización de las enzimas CA, CI y SO, completando así el diseño del biosensor de creatinina.

-Influencia de la naturaleza y concentración de mediador

La ausencia de interferencias es una condición indispensable para la aplicación del biosensor de creatinina al análisis de muestras reales. Desde el punto de vista electroquímico, el empleo de potenciales de medida menos extremos mejora la selectividad de los métodos, y esta posibilidad se logra con relativa facilidad empleando mediadores redox. En este caso, se investigó el empleo de un mediador redox para el peróxido de hidrógeno en presencia de HRP que fuera capaz de rebajar el potencial de medida. Con el fin de elegir el más adecuado para su incorporación a la matriz compósita AuNPs/MWCNTs/teflón, se seleccionaron tres: tetratiafulvaleno (TTF), ferroceno (Fc) y tetracianoquinodimetano (TCNQ) (ver Figura 37). Estos compuestos poseen una baja solubilidad en agua, por lo que pueden añadirse como un componente más del material del electrodo sin que se produzcan pérdidas cuando éste se introduce en la disolución de medida.

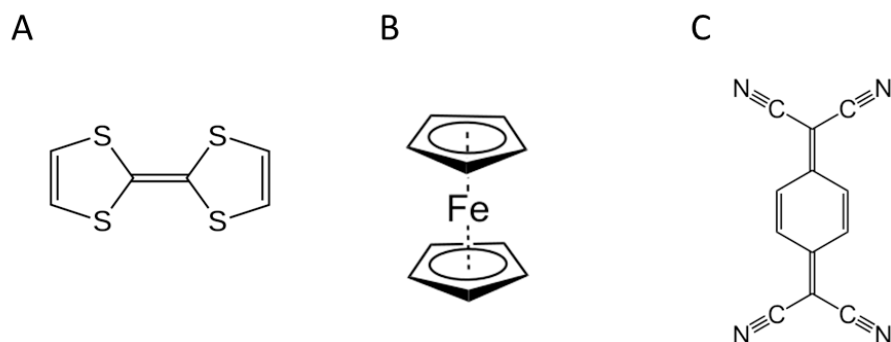


Figura 37.- Compuestos utilizados como mediadores redox: (A) tetratiafulvaleno (TTF); (B) ferroceno (Fc); (C) tetracianoquinodimetano (TCNQ)

Una vez preparados distintos electrodos HRP/MED/AuNPs/MWCNTs/teflón, por incorporación a la matriz compósita de 224 unidades de HRP y 1.0 mg de cada uno de los mediadores ensayados, se midió la respuesta amperométrica de H_2O_2 0.1 mM en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4, a un potencial de 0 V vs Ag/AgCl. Como ejemplo, algunas de las señales registradas se muestran en la Figura 38.

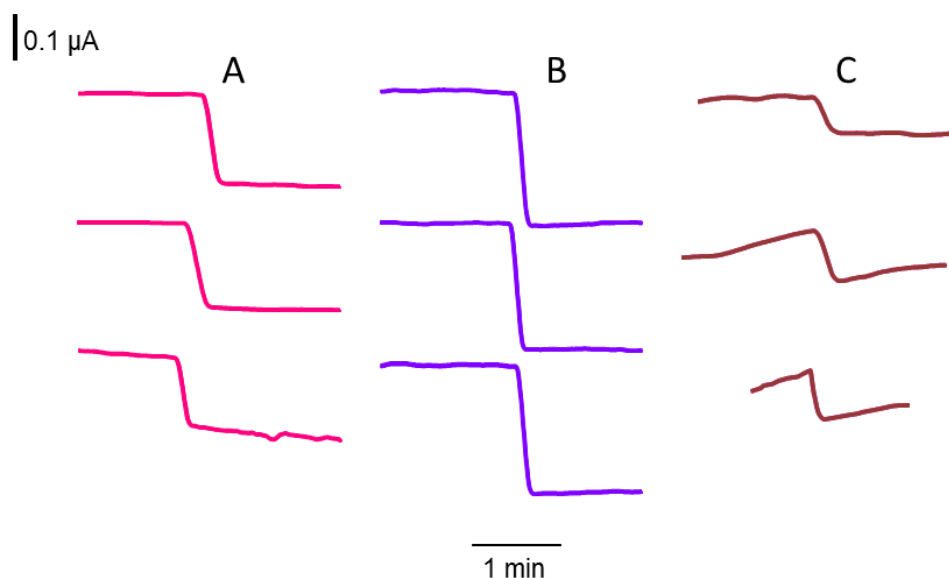


Figura 38.- Señales amperométricas de H_2O_2 0.1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4 sobre HRP/MED/AuNPs/MWCNTs/teflón, con MED: (A) TTF; (B) Fc; (C) TCNQ. E = 0 V vs. Ag/AgCl.

Como puede apreciarse, las respuestas mejor definidas y de mayor intensidad se obtuvieron empleando ferroceno como mediador. El TTF también permitió obtener señales analíticamente útiles, aunque de menor magnitud, mientras que en el caso del TCNQ, se observó que era necesario un mayor tiempo de estabilización antes de poder realizar la adición de H_2O_2 .

Empleando disoluciones de H_2O_2 5 mM y manteniendo las mismas condiciones experimentales que en el ensayo anterior, se compararon las respuestas obtenidas por voltamperometría cíclica para los diferentes mediadores propuestos (Figura 39). Como puede observarse, la curva mejor definida es la del ferroceno, apareciendo un pico de reducción del catión Fc^+ a un potencial de -181 mV vs. Ag/AgCl. Sin embargo, la respuesta del TCNQ aparece mucho peor definida, mostrando además una intensa corriente de fondo, con un hombro de reducción apenas perceptible a valores de potencial mucho más negativos. Finalmente, en el caso del TTF, la corriente es mucho menor en el intervalo de potencial estudiado, y no se aprecia ningún pico característico.

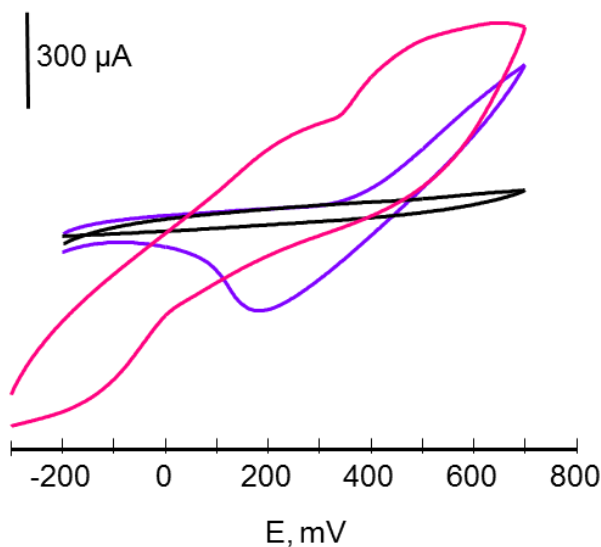


Figura 39.- Voltamperogramas cíclicos de H_2O_2 5 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4 sobre diferentes biosensores HRP/MED/AuNPs/MWCNTs/teflón: (violeta) Fc; (fucsia) TCNQ; (negro) TTF.

Por otro lado, en la Figura 40 se han representado los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el peróxido de hidrógeno sobre electrodos de diferente composición, con el fin de comprobar el funcionamiento del biosensor preparado con ferroceno como mediador. Puede observarse (Figura 40) que únicamente aparece respuesta de reducción significativa en el intervalo de potencial estudiado, sobre el biosensor preparado en presencia de ferroceno, lo que demuestra la utilidad de esta configuración como plataforma electroquímica para detectar el peróxido de hidrógeno producido en la secuencia de reacciones enzimáticas de la creatinina.

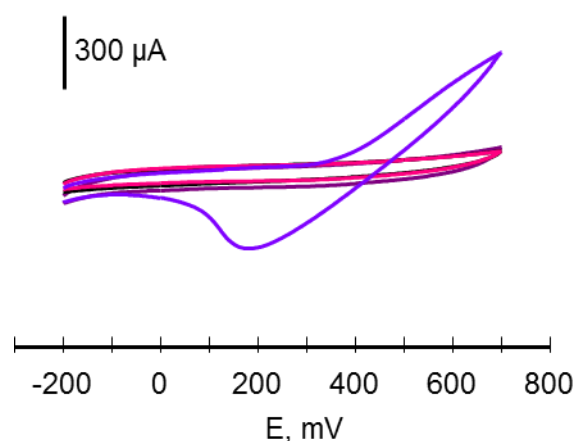


Figura 40.- Voltamperogramas cíclicos de H₂O₂ 5 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4 sobre diferentes biosensores: (1) MWCNTs/teflón; (2) AuNPs/MWCNTs/teflón; (3) HRP/AuNPs/MWCNTs/teflón; (4) HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón.

Una vez seleccionado el ferroceno como mediador redox más adecuado, se estudió el efecto de su concentración sobre la respuesta del biosensor. Para ello se prepararon diferentes bioelectrodos con cantidades de mediador comprendidas entre 1 y 5 mg, y se midió la respuesta amperométrica de disoluciones de H₂O₂ 1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4. Los resultados obtenidos (Figura 41) permiten apreciar un máximo de corriente para 2 mg de Fc, cantidad que se eligió como óptima para el trabajo posterior. La disminución de la señal para concentraciones

superiores de mediador se debe probablemente a la disminución de la conductividad del material compósito.

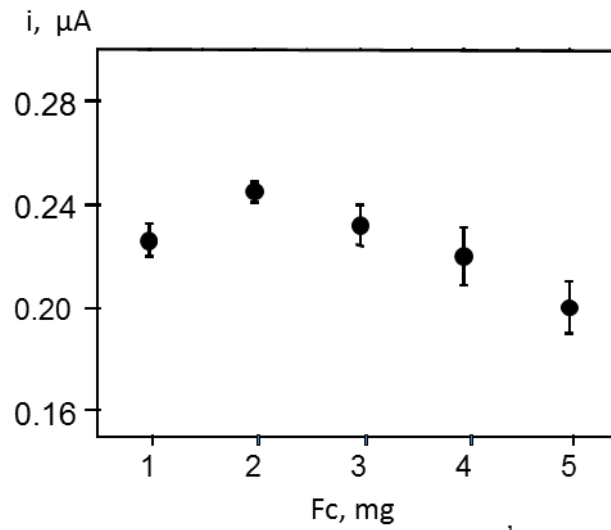


Figura 41.- Influencia de la concentración de ferroceno sobre la respuesta amperométrica del biosensor HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón para adiciones de H_2O_2 0.1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4. $E = 0$ V vs Ag/AgCl

-Elección del potencial de medida

Esta variable se optimizó estudiando su influencia sobre la respuesta amperométrica del biosensor. Para ello, se investigó la variación de la corriente total y de la corriente en estado estacionario con el potencial aplicado, en el intervalo de -200 a +200 mV, para disoluciones de H_2O_2 0.1 mM. Los resultados representados en la Figura 42 muestran un aumento de la corriente catódica total a medida que el potencial de detección se hace menos positivo, siendo este aumento más intenso a potenciales menores de 0 V, debido a la mayor velocidad de reducción del mediador. Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo observado en [Tripathi, 2006]. Por otro lado, al igual que lo observado por otros autores [Senel, 2010], la magnitud de la corriente de fondo a potenciales negativos es elevada, tal como se puede deducir de la comparación de la corriente total y los valores de la intensidad en estado estacionario.

Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió un valor de potencial de 0.0 V como más adecuado para llevar a cabo la detección de H_2O_2 . A este potencial, la reducción electroquímica del ferricinio proporciona corrientes de magnitud suficiente como para alcanzar una buena sensibilidad en la detección de H_2O_2 . Hay que destacar que, si bien el valor elegido coincide con el empleado en otras aplicaciones que utilizan sistemas equivalentes al de este trabajo, con ferricinio como mediador [Oungpipat, 1995; Zheng, 2008], es bastante menos positivo que los utilizados en la mayor parte de los métodos descritos en la bibliografía para el diseño de biosensores de creatinina (ver Tabla 7), lo que minimiza las posibles interferencias de especies electroactivas. Finalmente, a este potencial se observó una elevada rapidez de respuesta, alcanzándose el 95% del máximo de corriente a un tiempo de 9 segundos, así como una excelente repetibilidad de las señales, con una desviación estándar relativa del 2.2% (n=5), para adiciones repetidas sobre un mismo biosensor.

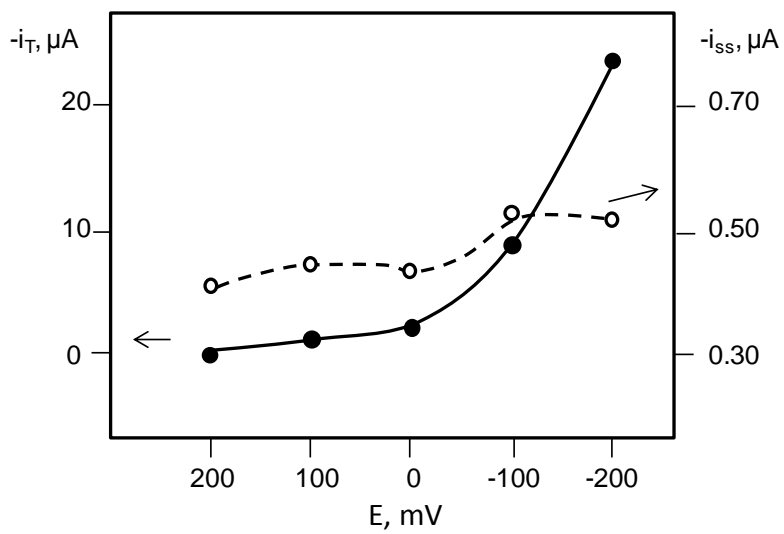


Figura 42.- Influencia del potencial aplicado sobre la corriente total (—) y sobre la corriente estacionaria (- -) para H_2O_2 0.1 mM en medio PBS 0.1 M de pH 7.4.

-Influencia de la cantidad de HRP

Se optimizó la cantidad de HRP en la matriz compósita por medida de disoluciones de H_2O_2 0.1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4, empleando diferentes biosensores preparados con cantidades de enzima en el intervalo comprendido entre 224 y 1120 U. En la Figura 43 se han representado los resultados obtenidos, apreciándose un aumento lineal de la corriente hasta aproximadamente 896 U, y una respuesta sólo ligeramente superior (aproximadamente un 7%) a la máxima cantidad de HRP empleada.

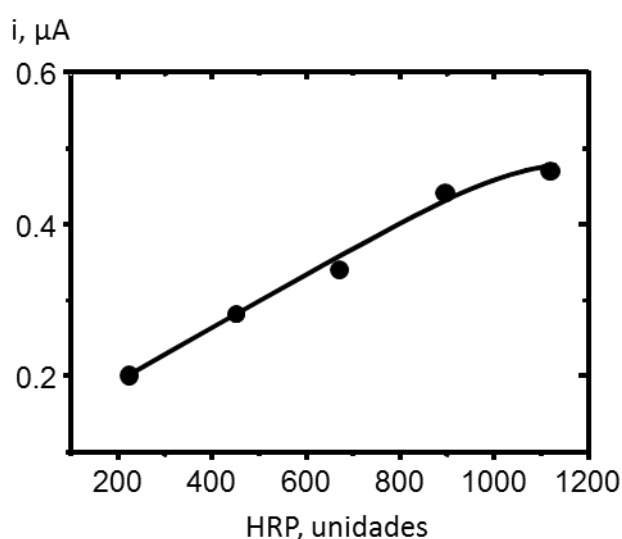


Figura 43.- Influencia de la cantidad de HRP en la matriz compósita sobre la respuesta amperométrica del biosensor HRP-Fc-AuNPs/MWCNTs/teflón. $E = 0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$

En este caso, la cantidad de enzima se eligió con el doble objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad al tiempo que una buena reproducibilidad en la preparación del material compósito. Para ello, se prepararon cinco electrodos diferentes para las dos cantidades de HRP indicadas anteriormente, registrándose las señales amperométricas correspondientes, a partir de las que se obtuvieron los valores de RSD del 4.7% y del 11.4 %, respectivamente, para 896 U y 1120 U de HRP. Posiblemente, la falta de reproducibilidad del material preparado con la mayor cantidad de enzima se debe a la mayor dificultad de homogeneización de la pasta. Estos resultados llevaron a elegir 896 unidades de HRP como la cantidad más adecuada, que, además, supone un menor coste.

-Influencia del pH

Este estudio se realizó registrando medidas amperométricas con el biosensor HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón en disoluciones reguladoras fosfato 0.1 M ajustadas a distintos valores de pH en el intervalo comprendido entre 6.0 y 8.0. Este intervalo se ha elegido teniendo en cuenta que el funcionamiento del biosensor viene condicionado por la actividad enzimática y por el comportamiento electroquímico del mediador [Yoshimoto, 1976; Yadav, 2011].

En la Figura 44 se ha representado la variación de la corriente en estado estacionario de H_2O_2 0.1 mM en función del pH del medio. En ella se observa, como era de esperar, una zona estrecha de intensidades máximas a pH 7.4 y 7.5. A valores de pH inferiores, la corriente es algo menor, mientras que a pH 8 existe una fuerte disminución de la señal, como consecuencia de la inestabilidad de la enzima [Eshkenazi, 2000]. Por otro lado, la precisión de las medidas disminuye de forma notable cuando se ajustan valores de pH alejados de los señalados, debido probablemente a la menor capacidad reguladora de la disolución. Por todo ello, se eligió pH 7.4 como el más adecuado para el empleo del biosensor.

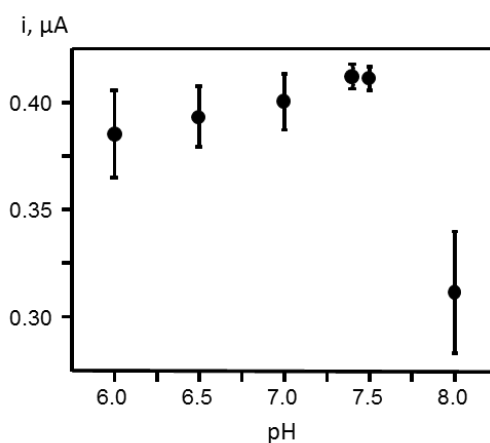


Figura 44.- Influencia del pH sobre la respuesta amperométrica para H_2O_2 0.1 mM en medio PBS 0.1 M. E = 0 V vs. Ag/AgCl.

-Inmovilización de las enzimas SO, CI y CA

Una vez optimizadas las variables experimentales del biosensor HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón, se procedió a estudiar la inmovilización de las enzimas responsables de la cadena de reacciones que da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. Para ello, se ensayaron distintas estrategias dentro de dos posibles alternativas: a) incorporación de las biomoléculas a la matriz compósita y, b) adsorción sobre la superficie del electrodo.

- a) En el primer caso, las tres enzimas se incorporaron en forma sólida o en disolución a la mezcla formada por los nanotubos de carbono y las nanopartículas de oro. A continuación se añadieron el mediador y la enzima peroxidasa, se homogeneizó la pasta, y se completó el biosensor de creatinina tal como se describe en el Apdo. 4.5.1.2. Los resultados obtenidos en estas condiciones se han representado en la Figura 45a.
- b) En la segunda opción, las enzimas se adsorbieron sobre el electrodo compósito Fc/HRP/nAu/MWCNTs/teflón por deposición de una gota de disolución de la mezcla (CA+CI+SO) y posterior secado a 4°C. Además, dentro de esta opción, se estudiaron distintas posibilidades para mejorar la estabilidad y, en algún caso, la selectividad del biosensor, empleando glutaraldehído (GA) como agente entrecruzante, una película de Nafion, o una membrana de diálisis. Los resultados obtenidos en estos estudios se han representado en la Figura 45b.

Los diseños ensayados se evaluaron por comparación de las respuestas en amperometría en disoluciones agitadas de disoluciones de creatinina 0.1 mM en medio regulador fosfato de pH 7.4, a un potencial de 0.0 V. Como puede observarse (Figura 45a), cuando las enzimas se incorporan a la matriz electródica, únicamente se obtienen señales de corriente apreciables empleando la mezcla sólida.

En el caso de los biosensores preparados por adsorción de las biomoléculas sobre el electrodo, (Figura 45b), se apreciaron comportamientos muy diferentes dependiendo del material utilizado para estabilizar la superficie del biosensor. Así, en presencia de glutaraldehído o Nafion, no se observaron señales definidas, debido probablemente al impedimento que causan estas estructuras a la difusión de la creatinina hacia la superficie del electrodo. Por ejemplo, el Nafion, como es conocido, forma una película polimérica selectiva que rechaza la aproximación de las especies aniónicas. Dado que la creatinina ($pK_a = 4.98$) [Martínez, 1993] se encuentra cargada negativamente al pH de trabajo, resulta prácticamente imposible su interacción con la superficie del electrodo para reaccionar en presencia de las enzimas. Sin embargo, cuando se utilizó la membrana de diálisis, se obtuvieron señales amperométricas bien definidas y de elevada magnitud. Esto se debe, probablemente, a que este atrapamiento físico proporciona un microambiente adecuado para que se produzcan eficazmente las reacciones biocatalíticas, y permite la aproximación de la creatinina a la superficie del biosensor, Por ello, se eligió esta última estrategia para la preparación del biosensor multienzimático de creatinina. Hay que destacar que el biosensor preparado en ausencia de las enzimas CA, CI y SO no responde a la creatinina (Fig. 45b6), ya que es necesaria la formación de peróxido de hidrógeno para obtener las señales amperométricas, una vez catalizada la reacción en presencia de HRP y de ferroceno.

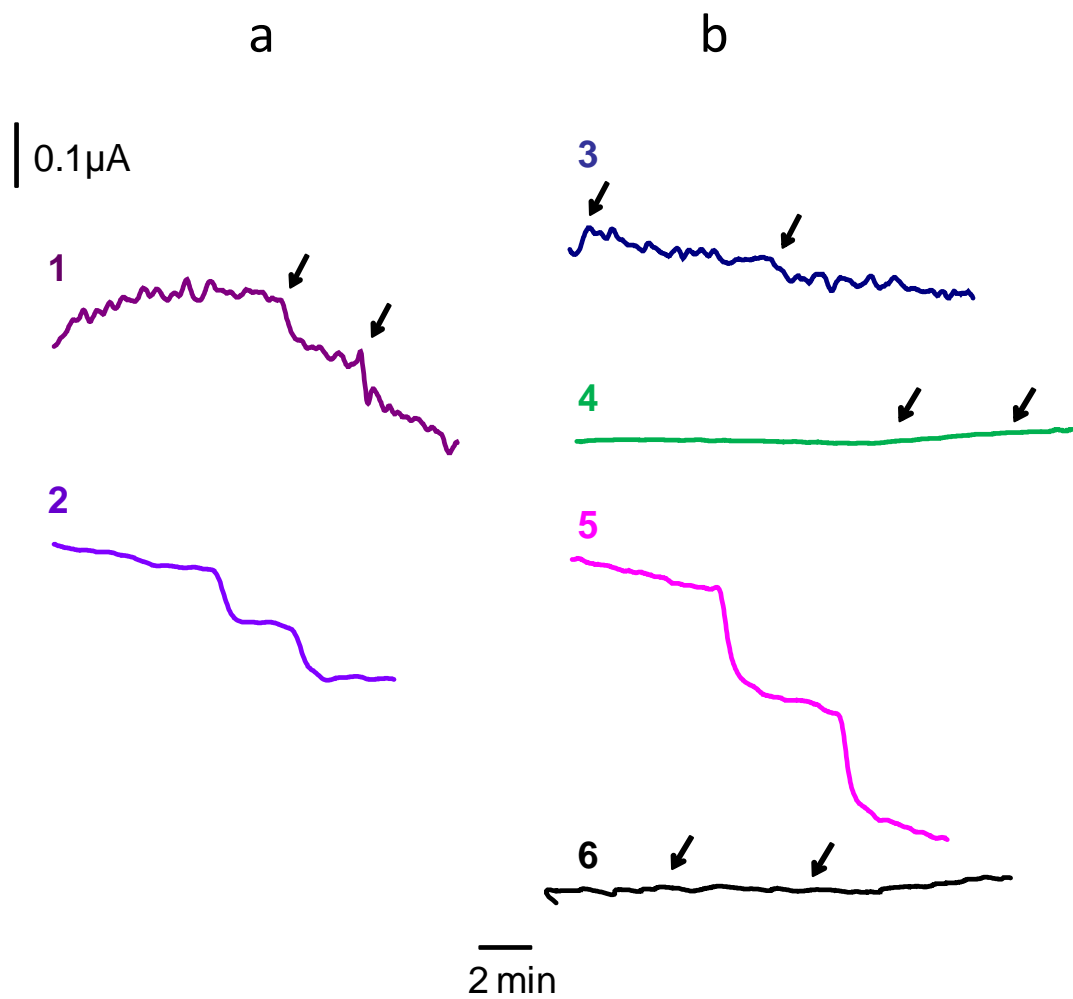


Figura 45.- Respuestas amperométricas para creatinina 0.1 mM en medio PBS 0.1M de pH 7.4. SO: Cl: CA (2.4: 8.8: 1.0); E = 0 V vs Ag/AgCl). a) Incorporación de las enzimas a la matriz del electrodo: 1) disolución; 2) mezcla sólida; b) Inmovilización sobre la superficie del electrodo: 3) con película de Nafion; 4) con glutaraldehído; 5) con membrana de diálisis; 6) con membrana de diálisis sin SO/Cl/CA.

-Influencia de las cantidades de CA, CI y SO

Empleando la configuración seleccionada, se estudió la influencia de la cantidad de cada una de las enzimas implicadas sobre la respuesta del biosensor, preparando varios electrodos con distintas unidades de enzima comprendidas entre 10 y 40 U (SO), 2.4 y 24 U (CI), y 23.4 y 117 U (CA). La optimización de cada una de ellas se llevó a cabo en presencia de la/las enzimas necesarias para generar el sustrato correspondiente a la enzima en estudio, es decir, sarcosina, creatina y creatinina, en concentración 0.05 mM en medio PBS 0.1 M de pH 7.4. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 46.

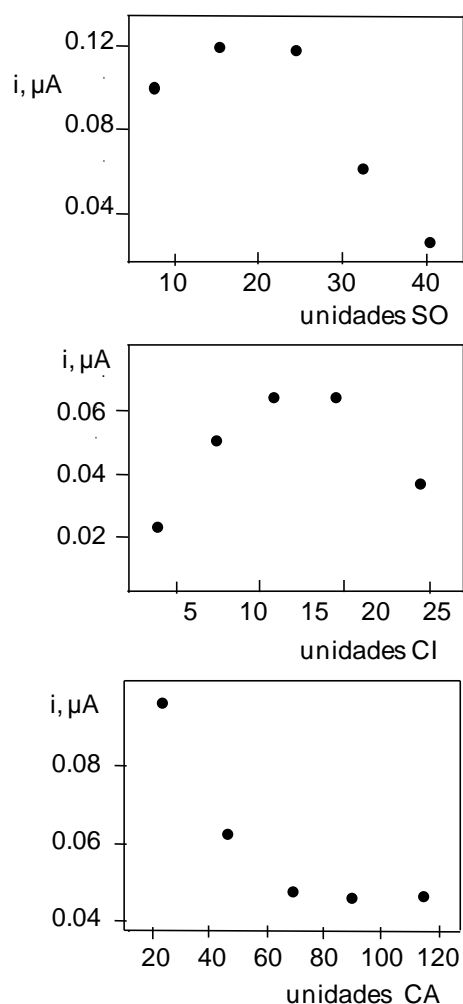


Figura 46.- Influencia de la cantidad de enzima SO, CI, y CA inmovilizada sobre el biosensor en la respuesta amperométrica de sarcosina, creatina y creatinina 0.05 mM, respectivamente.

Cuando se estudió la influencia de la cantidad de SO inmovilizada en el bioelectrodo HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón sobre las respuestas amperométricas obtenidas por adición de sarcosina, se apreciaron valores máximos de la corriente entre 16 y 24 unidades de enzima. Este resultado llevó a elegir la primera como más adecuada. Por otro lado, al variar la cantidad de Cl inmovilizada sobre el biosensor SO/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón, registrando los amperogramas por adición de creatina, se observó un máximo de respuesta para 12 unidades de enzima, que fue el valor elegido en este caso. Finalmente, se prepararon diferentes biosensores (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón con los valores seleccionados anteriormente, y se estudió la influencia de la cantidad de CA, por medida de los amperogramas correspondientes a la adición de creatinina. Como puede observarse, en este caso se encontró una tendencia diferente a las anteriores, apreciándose la disminución rápida de la corriente con dicha cantidad. Consecuentemente, se eligió la menor de las estudiadas, 23.4 unidades, con el fin de obtener la máxima sensibilidad. Tanto en este caso como en los anteriores, el decrecimiento de las señales amperométricas en presencia de cantidades relativamente altas de enzima, se atribuye a un efecto de bloqueo de la superficie del electrodo.

Como resumen de los estudios de optimización realizados, en la Tabla 19 se muestran las variables estudiadas, los intervalos correspondientes y los valores elegidos como óptimos.

Tabla 19.- Condiciones experimentales óptimas de preparación y funcionamiento del biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón

Variable	Intervalo	Valor óptimo
relación MWCNTs/teflón	30/70 – 50/50	50/50 (12.5 mg) [Manso, 2007]
volumen de AuNPs, μL	45 - 225	90 [Manso, 2007]
pH	6.0 – 8.0	7.4
potencial, mV	-200 - +300	0.0
cantidad de HRP, unidades	224 - 1120	896
cantidad de Fc, mg	1 - 5	2
cantidad de SO, unidades	10 - 40	16
cantidad de Cl, unidades	2.4 - 24	12
cantidad de CA, unidades	23.4 - 117	23.4

5.1.2.2. Calibrado y características analíticas

En las condiciones de medida previamente optimizadas, se obtuvo el calibrado para la determinación de creatinina que se muestra en la Figura 47. Como puede observarse, se ha representado la curva de saturación para el biosensor desarrollado y el intervalo lineal correspondiente. A modo de ejemplo, aparecen también algunos de los amperogramas registrados para la obtención del calibrado.

En la Tabla 20 se resumen las características analíticas del método. Como puede observarse, el intervalo lineal está comprendido entre las concentraciones de creatinina de 3 y 1000 μM ($r = 0.9995$), que es adecuado para la aplicación del biosensor desarrollado al análisis de muestras reales.

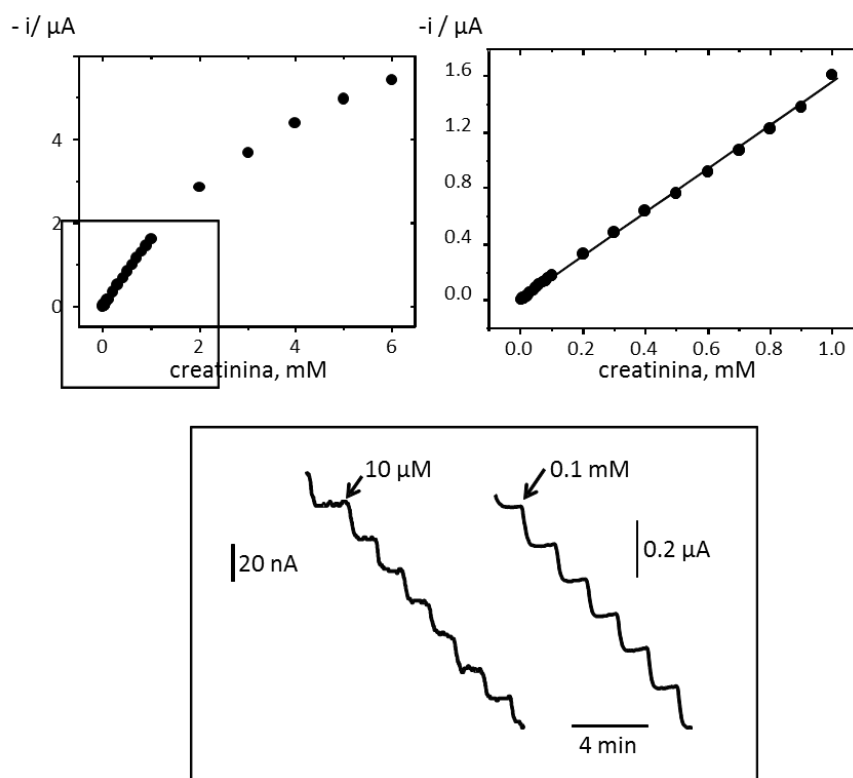


Figura 47.- Calibrados para la determinación de creatinina con el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón y amperogramas de adiciones de creatinina 10 μM (izda.) y 0.1 mM (dcha.). Ver el texto para más información

Tabla 20.- Características analíticas del método para la determinación de creatinina

Característica	Valor
Intervalo lineal (μM)	3 - 1000 ($r = 0.9995$)
Pendiente ($\mu\text{A}/\text{M}$)	1.59 ± 0.01
Límite de detección (μM)	0.1
Límite de cuantificación (μM)	0.3
RSD (%) ($n = 10$)	2.6

El límite de detección se calculó aplicando el criterio de $S/N = 3$ por medida repetida ($n=10$) de las señales amperométricas correspondientes a la concentración mas baja medible del calibrado (0.003 mM). El valor medio de las corrientes medidas fue de 1.92 nA equivalente a $5s_b$. Con este dato, se sustituyó el valor de $3s_b$ en la ecuación del calibrado: $i (\mu\text{A}) = 1.59 \mu\text{A}/\text{mM}$ [creatinina] + 0.001, obteniéndose una concentración 0.1 μM (LOD), y un límite de cuantificación ($10s_b/m$), igual a 0.3 μM . Finalmente, se evaluó la repetibilidad de las medidas, registrando diez amperogramas sucesivos con el mismo biosensor, sin regenerar la superficie del electrodo, pero con diferentes disoluciones de creatinina 0.1 mM. El valor de la desviación estándar relativa, $RSD = 2.6 \%$, pone de manifiesto la buena precisión de las señales.

Cuando estas características se comparan con las de otras configuraciones similares descritas en la bibliografía (ver Tabla 7 de la Introducción), se observan varias ventajas. En primer lugar, para una más fácil comparación, se expresó la pendiente del calibrado en unidades relativas al área del electrodo, teniendo en cuenta el área geométrica del mismo: 0.059 cm^2 , obteniéndose un valor de 27 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$. Como puede observarse, este resultado es del mismo orden de magnitud que los obtenidos en otras configuraciones recientes de biosensores de creatinina [Hsiue, 2004; Stefan, 2003; Yadav, 2011; Yadav, 2011a]. Además, el límite de detección es de los mas bajos encontrados en la bibliografía, sólo comparable al obtenido con un biosensor basado en la inmovilización covalente de las enzimas sobre un electrodo de c-MWCNT/PANI/Pt [Yadav, 2011]. Finalmente, el intervalo lineal se extiende en un intervalo más amplio que la mayoría de las otras configuraciones descritas hasta el momento.

5.1.2.3. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad del método de determinación de creatinina con el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón se evaluó mediante comparación de las corrientes en estado estacionario de los amperogramas obtenidos por adición de creatinina 0.05 mM, empleando cinco biosensores diferentes preparados de la misma manera. Los resultados obtenidos proporcionaron una desviación estándar relativa del 4.2 % (n=5), valor que pone de manifiesto la fiabilidad del procedimiento de preparación del biosensor multienzimático.

Por otro lado, se estudió el tiempo de vida útil del biosensor realizando cada día tres medidas con un mismo bioelectrodo de disoluciones de creatinina 0.05 mM. Con el fin de establecer las mejores condiciones para su conservación, se estudió la influencia del tiempo de preparación sobre las respuestas amperométricas, empleando dos biosensores diferentes preparados de la misma manera. Uno de ellos se mantuvo sumergido en PBS 0.1 M de pH 7.4, mientras que el otro se ha almacenó en condiciones de humedad controlada, llevando a cabo este proceso a 4 °C en ambos casos.

Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 48 en forma de gráfico de control, mostrándose los límites de $\pm 3s$, donde s es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de empleo del biosensor. Como puede observarse, cuando el biosensor se conserva en condiciones de humedad controlada, es posible obtener respuestas de corriente reproducibles dentro de los límites establecidos, durante aproximadamente 15 días. Sin embargo, cuando el biosensor se almacenaba en disolución reguladora PBS 0.1 M de pH 7.4, se producía un rápido descenso de la señal en los primeros tres días transcurridos desde su preparación. Este fenómeno puede atribuirse a un posible hinchamiento de la pasta del electrodo sumergido en el líquido, que no ocurre cuando únicamente se mantiene en un ambiente de humedad controlada en contacto con el aire. Por otro lado, también puede ocurrir que la inmersión en la disolución reguladora de pH favorezca la solubilización de alguno de los componentes del biosensor debido a una mayor hidratación de la membrana de diálisis.

Finalmente, debe destacarse la elevada estabilidad encontrada para un mismo biosensor en condiciones operativas, ya que es posible utilizarlo durante todo un día de trabajo, obteniéndose señales estables al menos durante 50 medidas sucesivas.

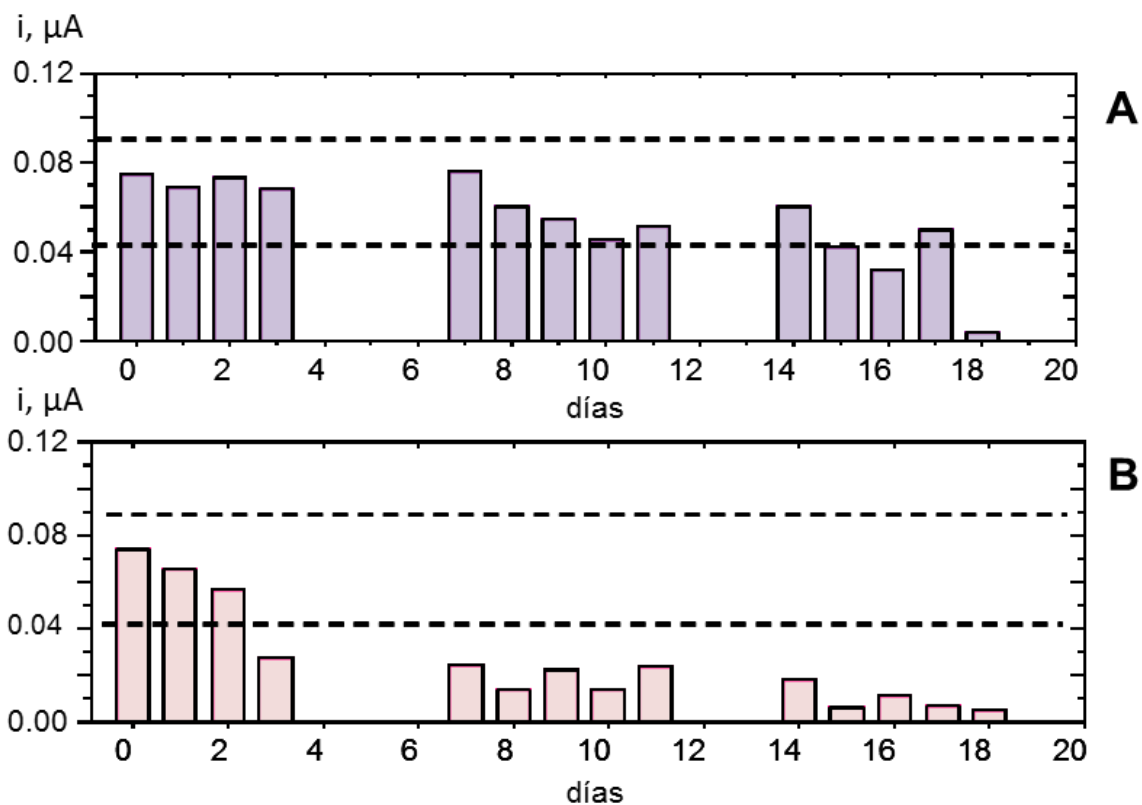


Figura 48.- Gráficos de control para evaluar la estabilidad del biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón: (A) almacenado en ambiente húmedo; (B) sumergido en PBS 0.1 M de pH 7.4

5.1 2.4. Parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de esta configuración, se comprobó primero el ajuste de su comportamiento al modelo de Michaelis-Menten. Para ello, al igual que se hizo en el capítulo anterior, se representó la ecuación de Hill (Figura 49), calculando el parámetro "x", cuyo valor resultó ser igual a 1.060 ± 0.007 . Este resultado demuestra el buen ajuste a dicho modelo. A continuación, teniendo en cuenta la complejidad del biosensor, cuya respuesta se debe al funcionamiento secuencial de cuatro enzimas, se investigó cuál de ellas estaba implicada en la reacción más lenta, con el fin de identificar la etapa limitante del proceso global. Para ello, se calcularon las constantes de velocidad aparentes de cada reacción enzimática, a partir de las representaciones de $\text{Ln } i$ en función del tiempo obtenidas por medida de las respuestas amperométricas de disoluciones de sustrato 0.05 mM. En la Figura 50 se muestran algunos de los resultados obtenidos. Por otro lado, en la Tabla 21 se resumen las constantes de velocidad aparentes calculadas a partir de las pendientes que aparecen en dichas representaciones.

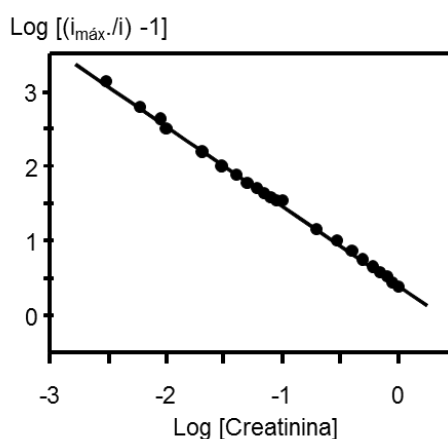


Figura 49.- Representación de Hill para los datos amperométricos obtenidos con el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón.



Figura 50.- Representaciones de $\ln i$ vs. t obtenidas a partir de las señales amperométricas correspondientes a disoluciones 0.05 mM de los sustratos indicados. PBS 0.1 M de pH 7.4; $E = 0.0$ mV vs. Ag/AgCl.

Tabla 21.- Constantes de velocidad aparentes calculadas para las reacciones enzimáticas implicadas en la respuesta del biosensor de creatinina.

Configuración	Sustrato	Coef. regresión, r	K_{ap} , min^{-1}
HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón	H_2O_2	0.993	0.460 ± 0.02
SO/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón	sarcosina	0.996	0.357 ± 0.006
(Cl/SO)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón	creatina	0.991	0.129 ± 0.003
(CA/Cl/SO)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón	creatinina	0.995	0.103 ± 0.002

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la reacción de hidrólisis de la creatinina catalizada por la enzima creatininasa es la más lenta, por lo que dicha etapa es la que limita el proceso global.

Los valores de la constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}) se calcularon, por tanto, teniendo en cuenta esta situación, utilizando la representación de Lineweaver-Burk para adiciones de creatinina desde 0.003 mM hasta 40 mM (Figura 51). A partir de los resultados obtenidos, los valores de $1/i$ frente a $1/[\text{creatinina}]$ proporcionaron una línea recta (Figura 51), de ecuación: $y = (0.11 \pm 0.02) + 0.456x$ ($r = 0.995$). Este resultado proporcionó los siguientes valores de los parámetros cinéticos:

$$V_{\max} = 9.1 \pm 0.3 \mu\text{A}$$

$$K_M^{ap} = 4.1 \pm 0.4 \text{ mM}$$

Cabe señalar que la constante de Michaelis-Menten obtenida es ligeramente menor que otros valores encontrados en la bibliografía. Por ejemplo, la inmovilización de las enzimas sobre un electrodo preparado con una película fina de negro de carbón que contenía un 10% de polvo de platino proporcionó un resultado de $K_M^{ap} = 5.15 \text{ mM}$ [Kim, 1999]. También se ha publicado una constante $K_M^{ap} = 5.2 \text{ mM}$ para un biosensor microfabricado de pasta de carbono [Hsiue, 2004]. Sin embargo, también hay que destacar otros valores más bajos de esta constante, como los encontrados empleando como plataformas de inmovilización y de detección los electrodos: c-MWCNTs/PANI/Pt, $K_M^{ap} = 0.26 \text{ mM}$ [Yadav, 2011], $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NPs/CHITg-PANI/Pt}$, $K_M^{ap} = 0.17 \text{ mM}$ [Yadav, 2012], ó $\text{ZnO-NPs/CHIT/c-MWCNTs/PANI/Pt}$, $K_M^{ap} = 0.35 \text{ mM}$ [Yadav, 2011a]. A la vista de estos resultados, se puede concluir que en las condiciones utilizadas para la inmovilización sobre el electrodo biocompuesto, existe una aceptable afinidad enzima-sustrato.

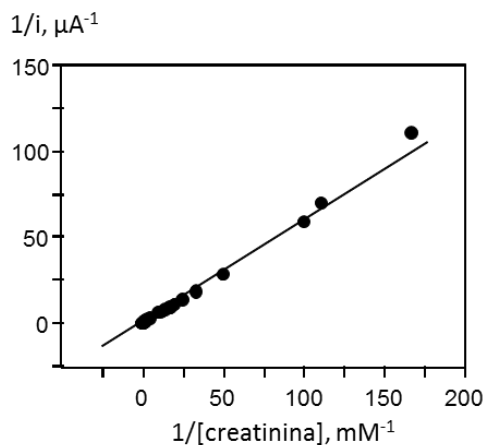


Figura 51.- Representación de Lineweaver-Burk para los datos amperométricos obtenidos con el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón.

5.1.2.5. Estudio de interferencias

Con el fin de evaluar la posibilidad de aplicar el biosensor desarrollado al análisis de muestras reales, se estudió el efecto de varias especies potencialmente interferentes sobre la respuesta amperométrica de la creatinina. Los compuestos investigados fueron: metionina (Met), ácido 4-amino fenil acético (AAPH), glicina (Gly), ácido ascórbico (AA) y ácido úrico (AU), que pueden estar presentes en las muestras reales en las que interesa realizar la determinación, o son compuestos modelo de otros de la misma familia que pudieran encontrarse en ellas [Tombach, 2001; Stefan, 2003]. Para ello, se llevaron a cabo medidas de la intensidad de corriente con el biosensor, a 0.0 mV vs Ag/AgCl, de disoluciones de las especies seleccionadas a un nivel de concentración 0.1 mM en PBS 0.1 M a pH 7.4.

Como puede observarse en la Figura 52, ninguna de las especies ensayadas exhibe respuesta electroquímica significativa al potencial empleado, por lo que no interfieren en la determinación de creatinina. Estos resultados demuestran la elevada selectividad del método desarrollado, lo que se debe, en gran medida, al valor del potencial de detección empleado.

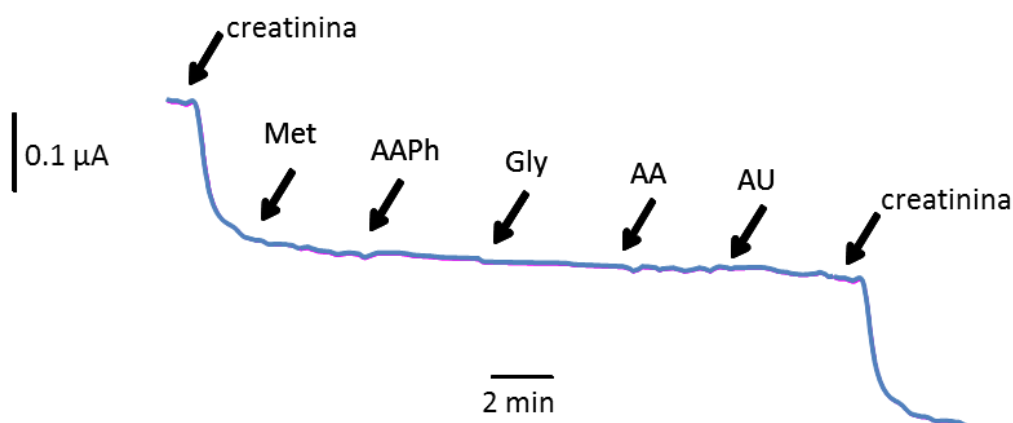


Figura 52.- Corrientes en estado estacionario medidas a 0.0 V con el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón en presencia de disoluciones 0.1 mM de cada una de las siguientes especies: metionina (Met), ácido 4-amino fenil acético (AAPH), glicina (Gly), ácido ascórbico (AA), y ácido úrico (AU).

5.1.2.6. Aplicación a la determinación de creatinina en suero humano

El biosensor desarrollado se aplicó a la determinación de creatinina en dos tipos de muestras de suero humano: un material de referencia certificado, con una concentración $68.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$, y una muestra liofilizada contaminada a niveles de 10, 50 y 90 μM .

En el caso del material de referencia, en primer lugar se evaluó la existencia de un posible efecto matriz debido a los componentes del suero. Para ello, se aplicó el procedimiento descrito en la Parte experimental (Apdo. 4.6.2) a alícuotas de la muestra, obteniendo un calibrado de adiciones patrón (Figura 53), cuya pendiente resultó ser igual a $1.32 \pm 0.04 \mu\text{A}/\text{mM}$. Este valor es significativamente diferente a la pendiente del calibrado externo, $1.59 \pm 0.01 \mu\text{A}/\text{mM}$, lo que demuestra que existe efecto matriz y, por consiguiente, fue necesario emplear el método de adiciones patrón para el análisis de las muestras. Los resultados obtenidos proporcionaron un valor medio ($n=3$) de $68 \pm 3 \mu\text{M}$, con una recuperación media del $98 \pm 4\%$, lo que pone de manifiesto la exactitud del método desarrollado.

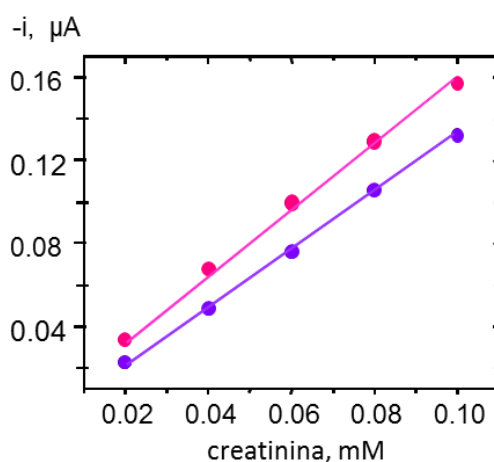


Figura 53.- Calibrados para creatinina: (—) adiciones patrón sobre alícuotas de suero certificado; (---) calibrado externo.

Para las muestras de suero contaminadas, se obtuvo primero un calibrado de adiciones patrón (Figura 54), cuya pendiente resultó ser $1.64 \pm 0.01 \mu\text{A}/\text{mM}$. La aplicación del test t de Student, para comparar con el calibrado externo proporcionó un valor de $t_{\text{exp}} = 1.025$ para un intervalo de confianza del 95%, inferior a $t_{\text{tab}} = 1.943$. Este resultado demuestra que no existen

diferencias significativas entre ambas pendientes, por lo que no existe efecto matriz, pudiéndose realizar la determinación de creatinina por interpolación en el calibrado externo.

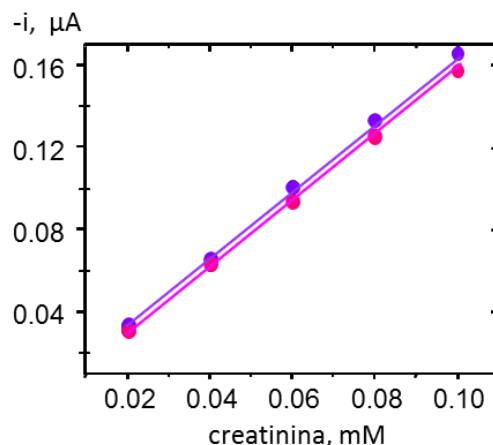


Figura 54.- Calibrados para creatinina: (----) adiciones patrón sobre alícuotas de suero contaminado; (----) calibrado externo.

Las concentraciones encontradas en el análisis repetido ($n=5$) de las muestras contaminadas con creatinina 10, 50 ó 90 μM fueron, respectivamente, $10.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$; $48 \pm 2 \mu\text{M}$, y $91 \pm 6 \mu\text{M}$, con porcentajes de recuperación comprendidos entre el 96 y el 105%. Además, la desviación estándar relativa, RSD, en todos los casos fue próxima al 3 %, lo que demuestra la buena precisión del método.

Finalmente, con el fin de evaluar la fiabilidad del biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón para la determinación de creatinina, se realizó un ensayo de correlación comparando los resultados obtenidos mediante el método desarrollado en este trabajo con los de un método bien establecido basado en la medida espectrofotométrica del producto formado por reacción con ácido pícrico [Jaffé, 1880]. Los resultados obtenidos (Figura 55) proporcionaron una línea recta ($r=0.9994$), con una pendiente de 1.00 ± 0.01 y una ordenada en el origen de -0.005 ± 0.008 , valores que demuestran una excelente correlación entre los métodos aplicados.

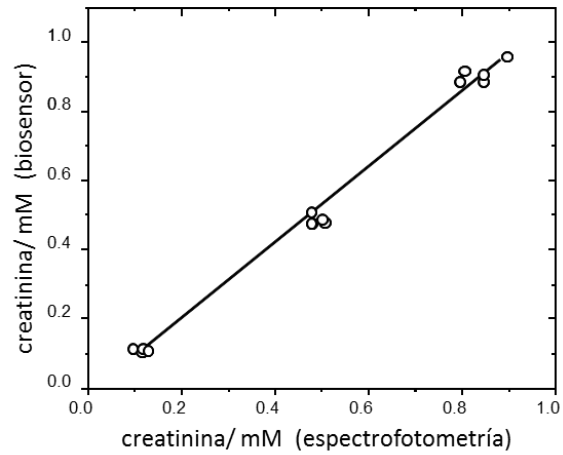
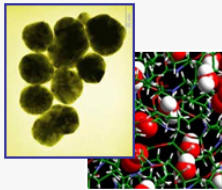


Figura 55.- Recta de correlación entre los resultados obtenidos en la determinación de creatinina en suero humano contaminado, mediante el biosensor (SO/Cl/CA)/HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/teflón (eje y) y el método de referencia mediante espectrofotometría UV-vis (eje x).

5.1.2.7. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado la utilidad de los materiales compósitos de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y teflón para la preparación de un biosensor multienzimático en el que una enzima auxiliar, la peroxidasa, y el mediador ferroceno se incorporan a la mezcla electrodica, mientras que otras tres enzimas necesarias para la catálisis secuencial de las reacciones del sustrato, se inmovilizan físicamente sobre la superficie del sensor, empleando una membrana de diálisis para asegurar una mayor estabilidad del conjunto. El biosensor presenta buenas características analíticas, destacando una elevada sensibilidad y rapidez de respuesta. Además, es posible emplear un potencial de detección de 0.0 V vs Ag/AgCl, inferior al empleado en otras configuraciones de biosensores similares.

La utilidad analítica del biosensor desarrollado ha quedado demostrada en el análisis de muestras de suero humano certificado o contaminado con creatinina a nivel fisiológico. La bondad de los resultados obtenidos, tanto a nivel de exactitud como de precisión, así como la buena correlación encontrada con un método de referencia espectrofotométrico, ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar este biosensor para la determinación de creatinina en este tipo de muestras clínicas sin necesidad de pretratamiento salvo una dilución adecuada.



**5.2. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E
INMUNOSENSORES BASADOS EN MATERIALES
HÍBRIDOS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y
POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS**

5.2.1. Biosensores de alcohol deshidrogenasa y tirosinasa basados en electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de oro y poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)

Como se ha señalado en la Introducción, los polímeros conductores electrónicos han demostrado su utilidad en el desarrollo de biosensores electroquímicos debido a que proporcionan un medio adecuado para la inmovilización de biomoléculas al tiempo que mejoran la velocidad de transferencia electrónica. El poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) es un polímero conductor con una elevada estabilidad electroquímica, que ha sido utilizado en diferentes aplicaciones, incluida la preparación de sensores [Groenendaal, 2000]. Este polímero se sintetiza normalmente a partir de su monómero en medio acetonitrilo [Melato, 2008] o en presencia de tensoactivos en disolución acuosa [Efimov, 2001]. Sin embargo, se ha visto que el empleo de líquidos iónicos (ILs) como medios para la polimerización de EDOT es muy adecuado, ya que éstos actúan simultáneamente como disolvente y electrólito soporte, acelerando el proceso y mejorando la morfología y la conductividad del polímero resultante [Wagner, 2005]. Por otra parte, como también se ha comentado, el empleo de nanocompuestos poliméricos por combinación de los polímeros conductores con nanopartículas metálicas, sobre todo de oro, mejora las propiedades de la superficie sensora, debido al efecto sinérgico o complementario que surge de la combinación de ambos materiales [Rajesh, 2009].

En este trabajo se desarrolló una plataforma electroquímica novedosa para la construcción de biosensores enzimáticos empleando tanto enzimas deshidrogenasas como oxidasas. Como ejemplos representativos de ambos grupos se utilizaron alcohol deshidrogenasa (ADH) y tirosinasa (Tyr), y las configuraciones resultantes se aplicaron a la determinación de etanol y de fenol, respectivamente. Las enzimas se inmovilizaron, en cada caso, sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro (AuNPs/SPCE) mediante atrapamiento en la red polimérica durante la etapa de electropolimerización de EDOT. Dicha etapa se realizó en medio líquido iónico puro, empleando hexafluorofosfato de 1 – butil - 3 - metilimidazolio (BMIMPF₆).

5.2.1.1. Preparación del electrodo

La plataforma electroquímica desarrollada en este trabajo se preparó sobre un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE). Dicho electrodo fue modificado con nanopartículas de oro y posteriormente se sintetizó una película polimérica de PEDOT, dando lugar a la configuración PEDOT/AuNPs/SPCE. Esta sistemática se utilizó también para preparar los biosensores de ADH y de Tyr, sin más que incluir la cantidad adecuada de enzima en la disolución del monómero a electropolimerizar por aplicación de un potencial constante.

5.2.1.2. Optimización de las condiciones de electropolimerización

En primer lugar se optimizó la modificación del electrodo serigrafiado con nanopartículas de oro, ya que éste (AuNPs/SPCE) sirve de plataforma para la preparación de la estructura polimérica. Como método de modificación se eligió el de adsorción de las nanopartículas sobre la superficie del electrodo previa deposición de un pequeño volumen de suspensión de oro coloidal comercial (Sigma), de 20 nm de diámetro de partícula, seguido de la evaporación del disolvente. Para elegir la cantidad más apropiada, se prepararon electrodos modificados con diferentes volúmenes de dicha suspensión, en el intervalo de 2 a 25 μL , y se midieron los voltamperogramas cíclicos de los electrodos sumergidos en una disolución de ácido sulfúrico 0.1 M. Como ejemplo, algunos de los voltamperogramas obtenidos se muestran en la Figura 56A. En ellos se observó la aparición de los picos de oxidación del oro y de reducción de los óxidos, característicos de estos electrodos, a partir de 10 μL de suspensión. La corriente del pico de reducción, que aparece a un potencial de +270 mV, se utilizó como criterio de optimización, con los resultados que aparecen representados en la Figura 56B.

Como puede apreciarse y, tal como era de prever, dicha corriente aumenta con el volumen de suspensión de oro coloidal en todo el intervalo estudiado. Debido a que la estabilidad del electrodo modificado es peor cuando se utilizan los volúmenes más altos (20 ó 25 μL), se eligió un volumen de 15 μL para estudios posteriores.

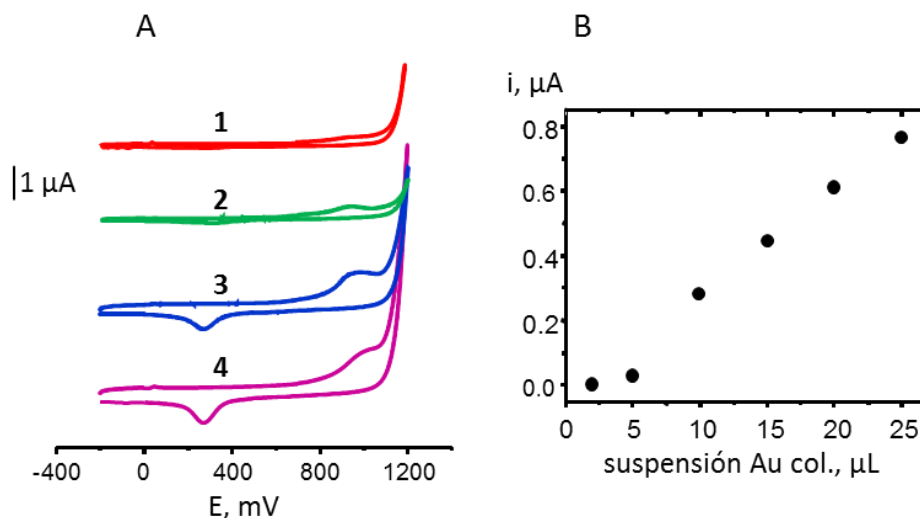


Figura 56.- (A) Voltamperogramas cíclicos de AuNPs/SPCEs preparados con: (1) 2 μL ; (2) 10 μL ; (3) 20 μL y (4) 25 μL de suspensión de oro coloidal; (B) variación de la corriente de reducción del AuNPs/SPCE con el volumen de suspensión de oro coloidal. H_2SO_4 0.1 M.

-Influencia del tiempo y el potencial de electropolimerización

Las variables que afectan a la electrogeneración del polímero, propiamente dicho, se optimizaron empleando NADH como sonda electroquímica, por medida de la corriente de oxidación de este compuesto mediante amperometría en disolución agitada. La electrosíntesis se realiza depositando cada vez 40 μL de disolución del monómero en medio líquido iónico BMIMPF₆ puro. Tal como se ha señalado anteriormente, los líquidos iónicos (ILs) constituyen un medio adecuado para la polimerización de EDOT [Wagner, 2005], actuando simultáneamente como disolvente y electrólito soporte [Ispas, 2009]. Entre los líquidos iónicos disponibles, se eligió el BMIMPF₆ debido a que las enzimas que posteriormente se van a utilizar para la preparación de los biosensores, ADH y Tyr, han demostrado mantener una buena actividad enzimática y estabilidad en dicho medio [Hussain, 2008; Yang, 2009a].

En la Figura 57 se han representado los resultados obtenidos en el estudio del efecto del tiempo empleado para la electropolimerización del monómero EDOT en la superficie del electrodo AuNPs/SPCE, sobre la corriente de oxidación de NADH 5.0×10^{-5} M, cuando el polímero se genera a +1.0 V y se aplica un potencial de detección de + 0.3 V. Puede observarse cómo un tiempo de 2 minutos es suficiente para que la respuesta alcance un valor máximo que permanece después prácticamente constante en todo el intervalo estudiado. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió un tiempo de 5 minutos para estudios posteriores, asegurando así el recubrimiento completo del electrodo.

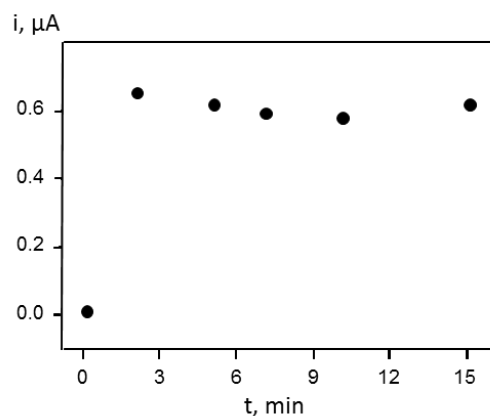


Figura 57.- Influencia del tiempo de electropolimerización de EDOT para la preparación del electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE.

Utilizando el tiempo optimizado anteriormente y manteniendo el resto de las condiciones experimentales, se estudió la influencia del potencial aplicado al electrodo en el proceso de electrogeneración del PEDOT, en el intervalo comprendido entre 0 y 1.0 V. En la Figura 58 se han representado los resultados obtenidos. Puede apreciarse que la respuesta de oxidación de NADH aumenta con el potencial aplicado, alcanzando un valor máximo a + 800 mV, mientras que, por encima de este valor, se observa una disminución de la corriente por lo que se eligió este valor para estudios posteriores.

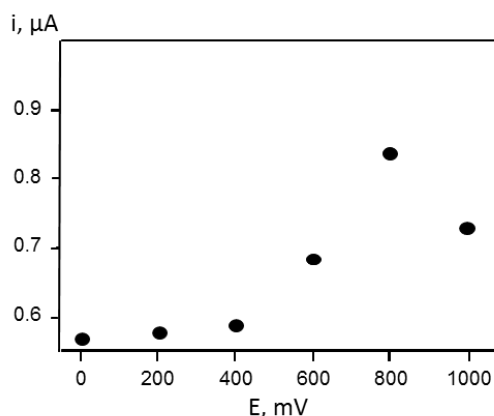


Figura 58.- Influencia del potencial de electropolimerización de EDOT para la preparación del electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE.

5.2.1.3. Caracterización de los electrodos PEDOT/AuNPs/SPCE

Se emplearon las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), voltamperometría cíclica (CV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) para caracterizar los electrodos en las diferentes etapas de su preparación. En la Figura 59 se han representado las micrografías electrónicas del electrodo serigrafiado sin modificar (Fig. 59a) y modificado con nanopartículas de oro (Fig. 59b), que se comparan con las del electrodo PEDOT/SPCE (Fig. 59c) y PEDOT/AuNPs/SPCE (Fig. 59d). Pueden apreciarse las nanopartículas de oro depositadas sobre la superficie del SPCE (Fig. 59b), con un tamaño medio de 46 ± 8 nm ($n = 50$), así como el recubrimiento oscuro y de aspecto liso y muy uniforme de la película de PEDOT depositado sobre el SPCE (Fig. 59c). Dicho aspecto cambia cuando el polímero se genera sobre la superficie del electrodo AuNPs/SPCE, apareciendo una superficie algo más rugosa que permite apreciar las nanopartículas de oro entremezcladas.

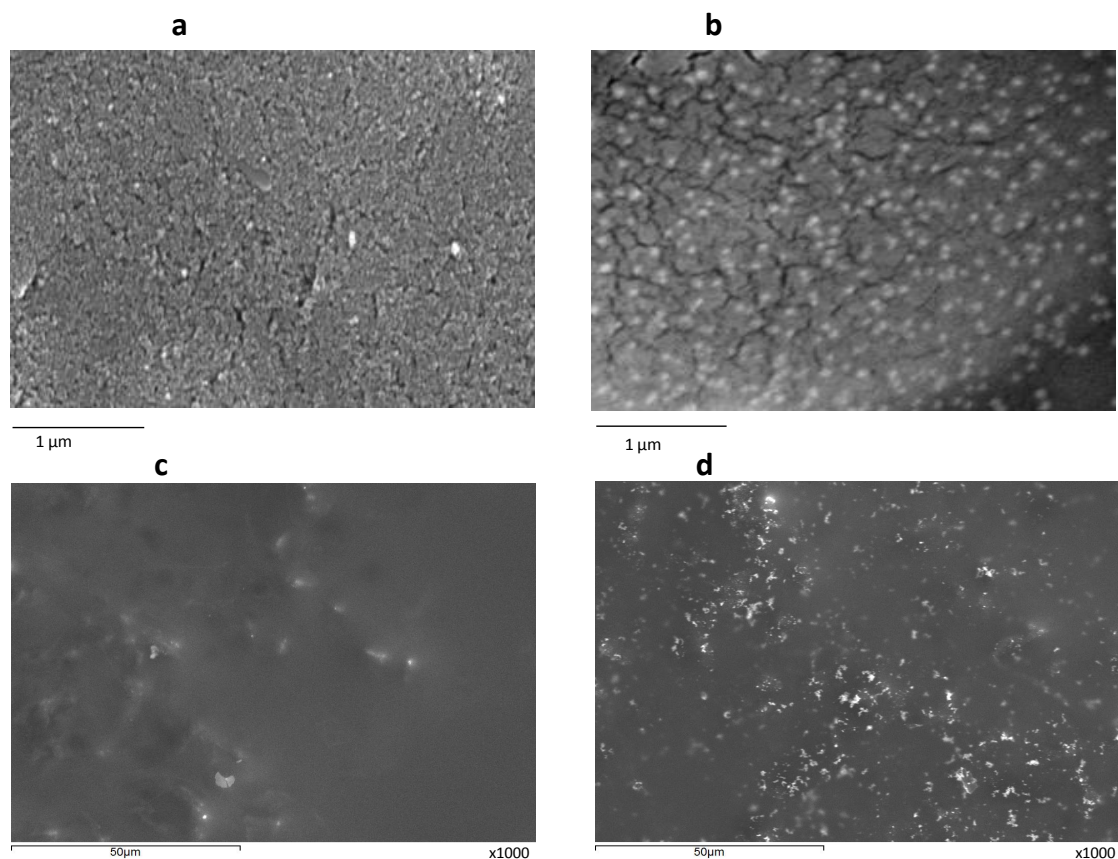


Figura 59.- Micrografías electrónicas de barrido: (a) SPCE; (b) AuNPs/SPCE; (c) PEDOT/ SPCE; (d) PEDOT/AuNPs/SPCE. Electropolimerización de EDOT en BMIMPF₆ a 800 mV, 5 min.

La Figura 60 muestra los voltamperogramas cíclicos de una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mM en KCl 0.1 M obtenidos sobre: SPCE (a), AuNPs/SPCE (b), PEDOT/SPCE (c) y PEDOT/AuNPs/SPCE (d). Como puede observarse, la presencia de las nanopartículas de oro sobre el electrodo serigrafiado conduce a una mejor definición del voltamperograma respecto del obtenido sobre el electrodo sin modificar, con un ligero aumento de las corrientes de pico anódico y catódico, siendo $i_{pa} = i_{pc} = 68 \mu\text{A}$ frente a $55 \mu\text{A}$, y una pequeña disminución de la separación entre ambos potenciales de pico, con $\Delta E = 197 \text{ mV}$ frente a 270 mV . Esto puede atribuirse a la mayor actividad electroquímica de la superficie electródica modificada con las nanopartículas de oro.

Por otro lado, el voltamperograma c, obtenido sobre el electrodo PEDOT/SPCE muestra cómo la presencia del polímero produce ligeros desplazamientos de los potenciales de pico anódicos y catódicos hacia valores menos y más positivos, respectivamente, dando lugar a una menor separación de picos, con $\Delta E = 162$ mV. Esto sugiere la existencia de un ligero efecto electrocatalítico por parte del PEDOT hacia el proceso electroquímico estudiado. Además, este efecto viene acompañado por un aumento notable de las corrientes de pico respecto a las obtenidas en los voltamperogramas a y b, siendo ahora $i_{pa} = 100$ μA e $i_{pc} = 103$ μA . Finalmente, cuando se emplean los electrodos PEDOT/AuNPs/SPCE, se obtienen voltamperogramas (curva d) en los que la separación de picos se mantiene, pero la magnitud de la corriente se ve de nuevo incrementada, con $i_{pa} = 125$ μA e $i_{pc} = 121$ μA . Esto sugiere un aumento del área superficial activa debido a la presencia de las nanopartículas.

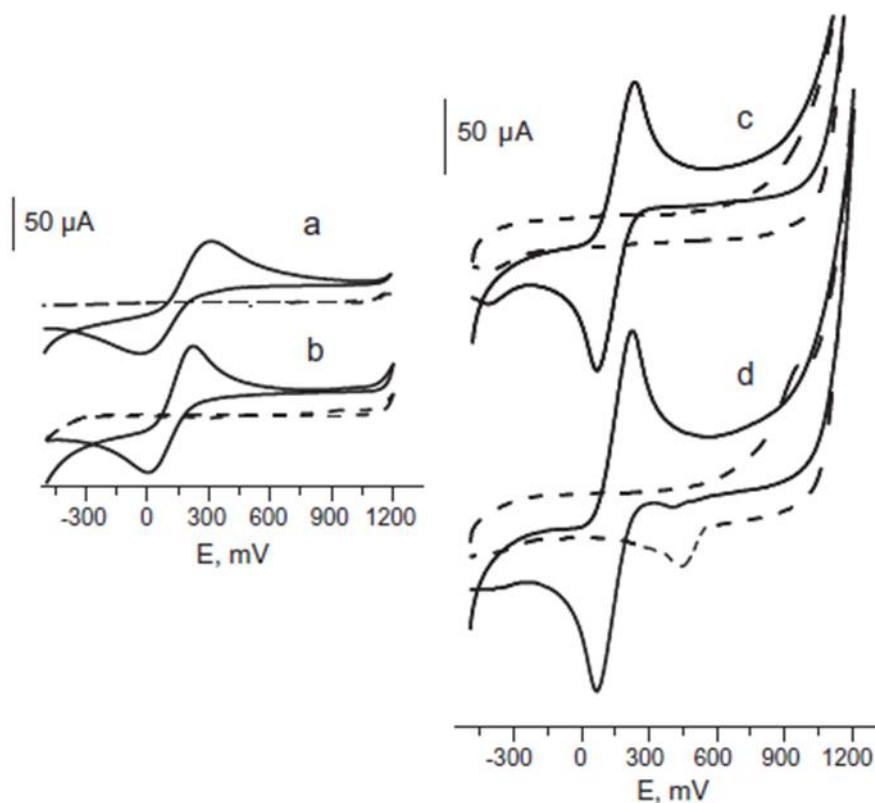


Figura 60.- Voltamperogramas ciclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre: a) SPCE; b) AuNPs/SPCE; c) PEDOT/SPCE; d) PEDOT/AuNPs/SPCE; $v = 50$ mV/s; (---) KCl 0.1 M

Los resultados obtenidos por aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica se han representado en la Figura 61. En ella se muestran los diagramas de Nyquist correspondientes a los electrodos anteriores registrados en presencia de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en medio KCl 0.1 M. Como puede apreciarse, la región circular del gráfico decrece notablemente al modificar el SPCE con nanopartículas de oro, lo que pone de manifiesto una disminución de la resistencia a la transferencia de carga con respecto al electrodo sin modificar. Por otro lado, en presencia de PEDOT se obtiene el espectro de impedancias típico de un electrodo modificado con un polímero conductor electrónico [Ferloni, 1996], sin que existan diferencias apreciables entre la superficie modificada sólo con PEDOT y la modificada con PEDOT y AuNPs. Esto indica que el polímero es el principal responsable de la disminución de la resistencia a la transferencia de carga de los electrodos modificados.

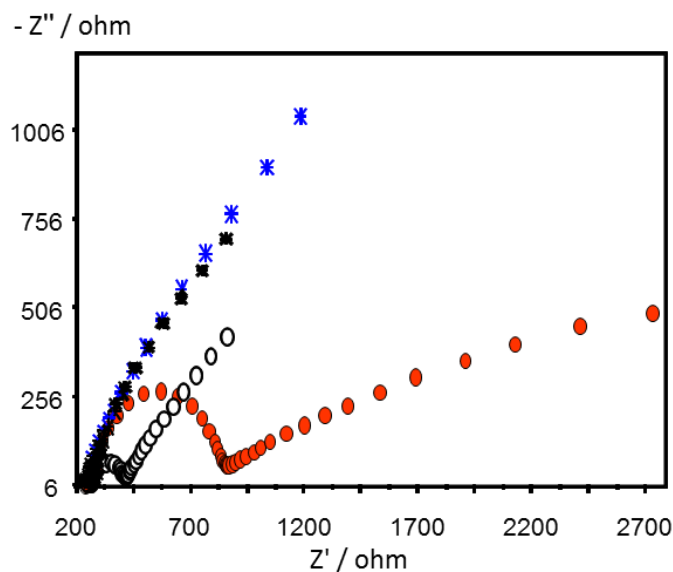


Figura 61.- Diagramas de Nyquist: ● SPCE, ○ AuNPs/SPCE, * PEDOT/SPCE, * PEDOT/AuNPs/SPCE; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la presencia de las nanopartículas de oro durante el proceso de electropolimerización no incrementa la conductividad de la superficie electródica, pero sí aumenta el área superficial activa del electrodo. Aunque existen muy pocos ejemplos acerca de la electrodeposición de polímeros

conductores sobre electrodos modificados con nanopartículas metálicas, se han encontrado datos al respecto empleando nanopartículas de cobre depositadas sobre un electrodo de oro [Pan, 2005]. Por otro lado, Liu et al. [Liu, 2006] y Kumar et al. [Kumar, 2010], también observaron un incremento de la superficie electródica al preparar polipirrol por electropolimerización empleando una suspensión de nanopartículas de oro y el monómero, lo que atribuyeron a un aumento de los centros de nucleación para la formación del polímero en presencia de las partículas, efecto que también se ha observado en nuestro caso.

5.2.1.4. *Detección amperométrica de NADH sobre PEDOT/AuNPs/SPCE*

Con el fin de establecer las mejores condiciones para la detección de NADH mediante amperometría en disolución agitada, se evaluó la influencia del potencial de medida en las respuestas de oxidación de dicho compuesto sobre el electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE preparado en las condiciones optimizadas previamente. Dicha influencia se estudió en el intervalo comprendido entre 0 y + 700 mV, obteniéndose los registros en estado estacionario a partir de adiciones de NADH 5.0×10^{-5} M sobre disoluciones de regulador PBS 0.1 M de pH 7.4. En la Figura 62 se han representado las diferencias entre estas medidas y la corriente de fondo, así como la propia corriente de fondo, observándose un valor máximo de la respuesta amperométrica de NADH a un potencial de + 300 mV, que fue elegido para medidas posteriores.

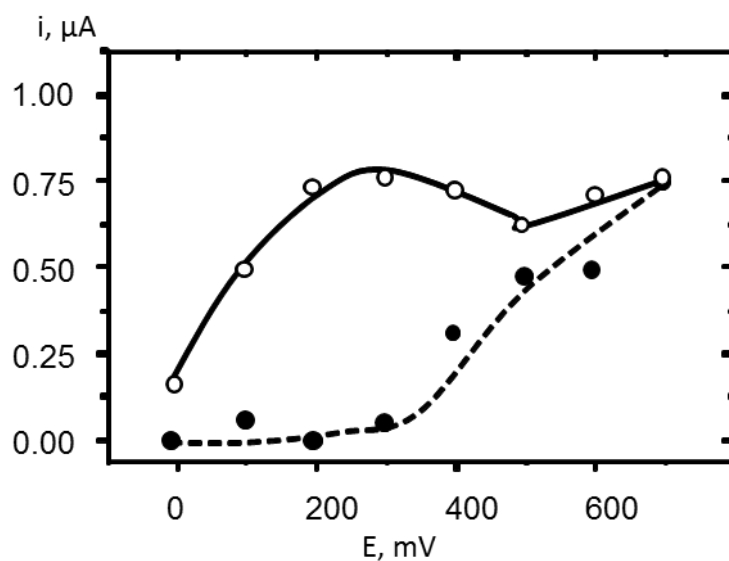


Figura 62.- Influencia del potencial aplicado en las señales amperométricas sobre PEDOT/AuNPs/SPCE: (○) NADH 5.0×10^{-5} M; (●) PBS 0.1 M de pH 7.4.

La Figura 63 muestra algunas señales amperométricas de NADH obtenidas a +300 mV sobre los electrodos PEDOT/SPCE y PEDOT/AuNPs/SPCE. Puede observarse cómo únicamente se obtienen respuestas de corriente analíticamente útiles cuando se utiliza el electrodo modificado con nanopartículas de oro y PEDOT. Por otro lado, los voltamperogramas cíclicos que se presentan en la misma figura, ponen de manifiesto la actividad electrocatalítica del polímero hacia la oxidación electroquímica de este compuesto, encontrándose una diferencia de más de 250 mV entre los potenciales de pico obtenidos sobre los electrodos PEDOT/AuNPs/SPCE y AuNPs/SPCE.

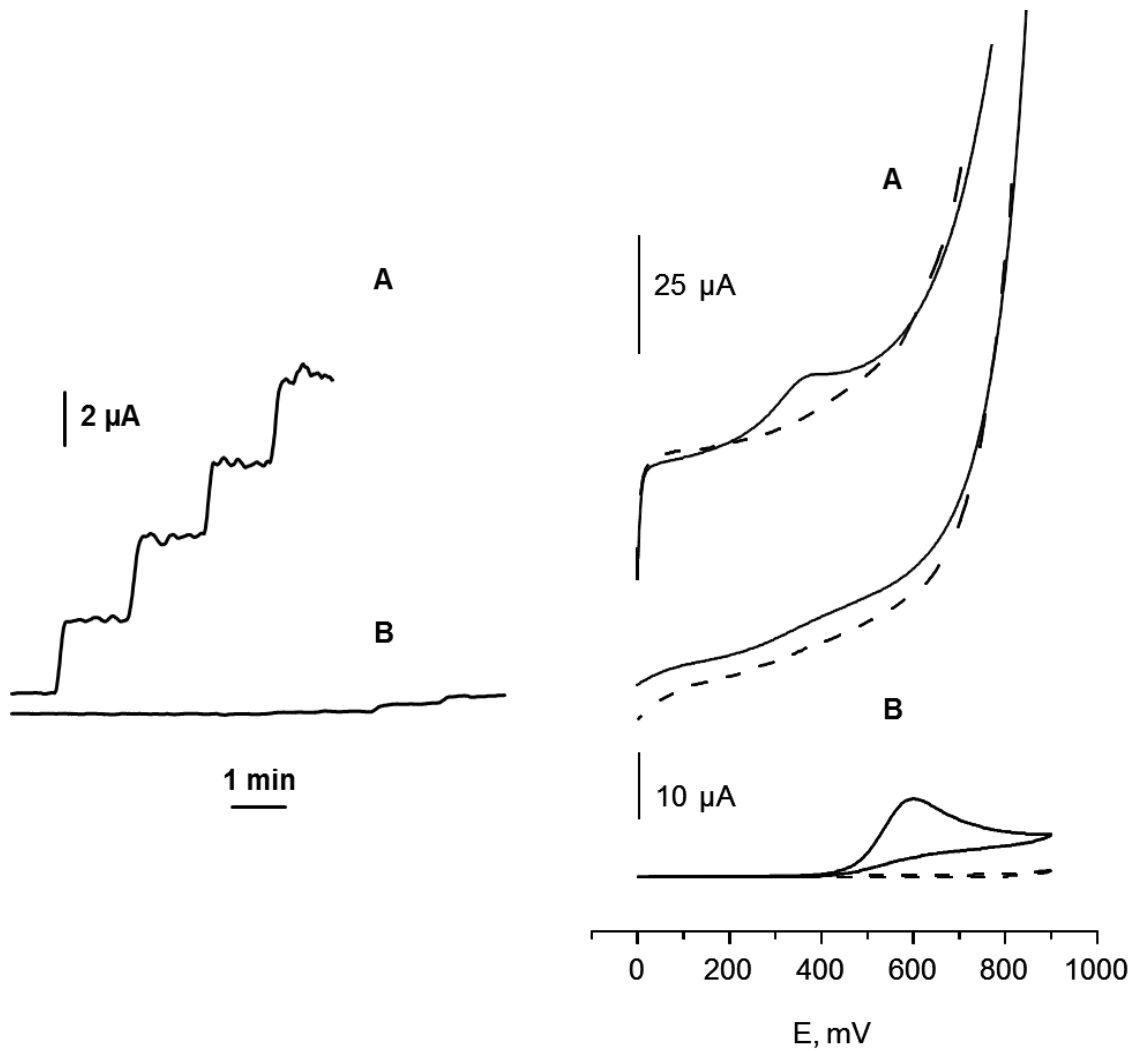


Figura 63.- (Izda.) Respuestas amperométricas de NADH 1.0×10^{-5} M (cada adición) sobre: (A) PEDOT/AuNPs/SPCE; (B) PEDOT/SPCE; $E = 300 \text{ mV}$; (dcha.) Voltamperogramas cíclicos de NADH 5.0×10^{-5} M sobre (A) PEDOT/AuNPs/SPCE; (B) AuNPs/SPCE; (- - -); $v = 20 \text{ mV/s}$.

-Calibrado para la determinación de NADH

Las características analíticas del calibrado obtenido para NADH sobre el electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE se resumen en la Tabla 22, comparándose con las correspondientes al electrodo preparado en ausencia de nanopartículas de oro. Cabe destacar que la pendiente del calibrado obtenido sobre el primer electrodo es más de un orden de magnitud superior a la del PEDOT/SPCE. Por otro lado, la sensibilidad alcanzada con ese electrodo es mucho más alta que la de otras configuraciones basadas en electrodos modificados con el mismo polímero o con nanopartículas de oro.

Tabla 22.- Características analíticas de los calibrados de NADH sobre PEDOT/AuNPs /SPCE y PEDOT/SPCE

	Intervalo Lineal, M x 10 ⁵	Pendiente, mA/M	Ordenada en el origen, μ A	r
PEDOT/AuNPs/SPCE	0.1 – 10	168	0.2	0.998
PEDOT/SPCE	1 – 100	12.4	0.12	0.9992

Por ejemplo Manesh et al. [Manesh, 2008], obtuvieron una sensibilidad de 88 mA/M·cm² usando un método amperométrico de determinación de NADH con un electrodo modificado con AuNPs/PEDOT-PSS. Este valor es muy inferior al obtenido con el electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE, cuya área geométrica es de 0.1256 cm² (m/A=701 mA/M·cm²). Además, dicha pendiente es también superior a la alcanzada con un electrodo compuesto de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y teflón, empleando el mismo valor de potencial, +300 mV [Manso, 2008], lo que pone de manifiesto las buenas características del electrodo desarrollado para la preparación de biosensores basados en enzimas deshidrogenasas y en la detección de NADH.

5.2.1.5. Preparación del biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE

En la Parte Experimental (Apdo. 4.5.1.3) se describió el procedimiento de preparación del biosensor de alcohol deshidrogenasa. Brevemente, una vez modificado el electrodo serigrafiado con las nanopartículas de oro, se electrodeposita el polímero a partir de una disolución de monómero (EDOT) y ADH en el líquido iónico BMIMPF₆. De este modo, la enzima queda atrapada en la red polimérica a medida que tiene lugar la generación de PEDOT en la superficie del electrodo. Este método se optimizó empleando etanol como sustrato de la reacción enzimática. Dicha reacción (Figura 64) conduce, en presencia de NAD⁺, a la formación de NADH cuya señal de oxidación se mide sobre el biosensor.

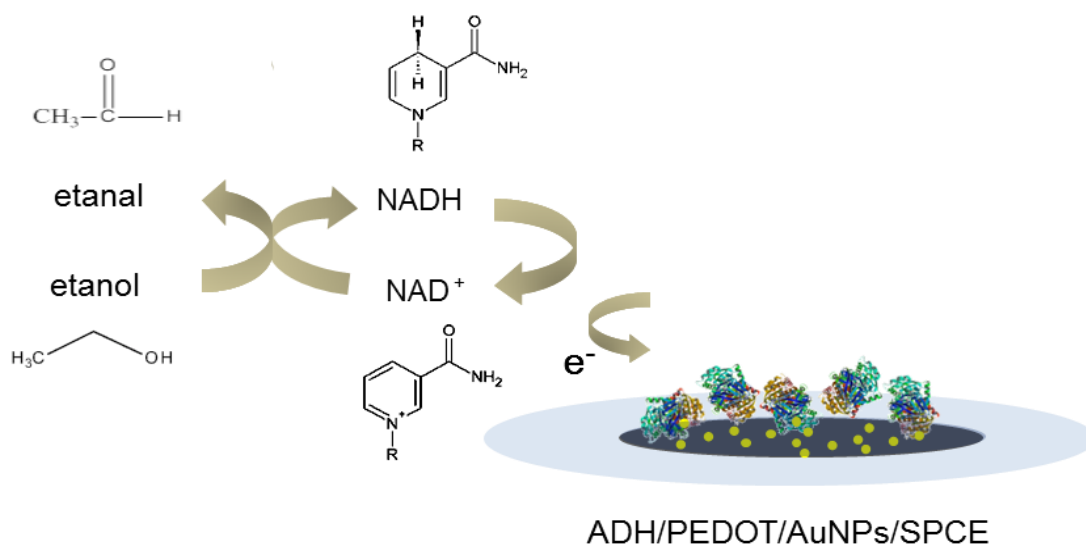


Figura 64.- Esquema de la preparación y funcionamiento del biosensor ADH/PEDOT/nAu/SPCE

A continuación se describen los estudios realizados para la optimización de las variables que afectan a la preparación y el funcionamiento del biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE.

-Influencia de la cantidad de nanopartículas de oro

Con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad en la determinación de etanol, se optimizó nuevamente la cantidad de nanopartículas de oro depositada en la superficie electródica. Para ello, se prepararon diferentes biosensores a partir de electrodos serigrafados modificados con distintos volúmenes de suspensión de oro coloidal en el intervalo comprendido entre 0 y 25 μL , midiendo la corriente de oxidación del NADH formado tras la adición de etanol, a un potencial de +300 mV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 65A. En ella puede observarse cómo la magnitud de la respuesta aumenta con la cantidad de AuNPs, alcanzándose un máximo para 15 μL de suspensión. Mayores volúmenes hacen disminuir el valor de dicha intensidad, debido a la falta de estabilidad del recubrimiento. Estos resultados coinciden apreciablemente con los obtenidos anteriormente (Apdo. 5.2.1.2.), por tanto, con el fin de alcanzar una alta sensibilidad, se eligió el valor citado para estudios posteriores. A continuación se compararon las respuestas amperométricas obtenidas sobre el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE con las correspondientes a los bioelectrodos preparados en ausencia de nanopartículas de oro (ADH/PEDOT/SPCE) y sobre un electrodo serigrafado de oro modificado con PEDOT (ADH/PEDOT/SPAuE).

Como puede apreciarse, al potencial de detección utilizado, la adición de etanol sobre el bioelectrodo nanoestructurado da lugar a corrientes en estado estacionario bien definidas, mientras que sobre el electrodo ADH/PEDOT/SPCE únicamente se obtiene una pequeña respuesta, aproximadamente de un 30% de la corriente anterior, y más lenta, no apareciendo señales medibles cuando se utiliza el biosensor preparado sobre el electrodo serigrafado de oro. Estos resultados demuestran nuevamente la utilidad del electrodo ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE para la preparación de un biosensor de alcohol deshidrogenasa.

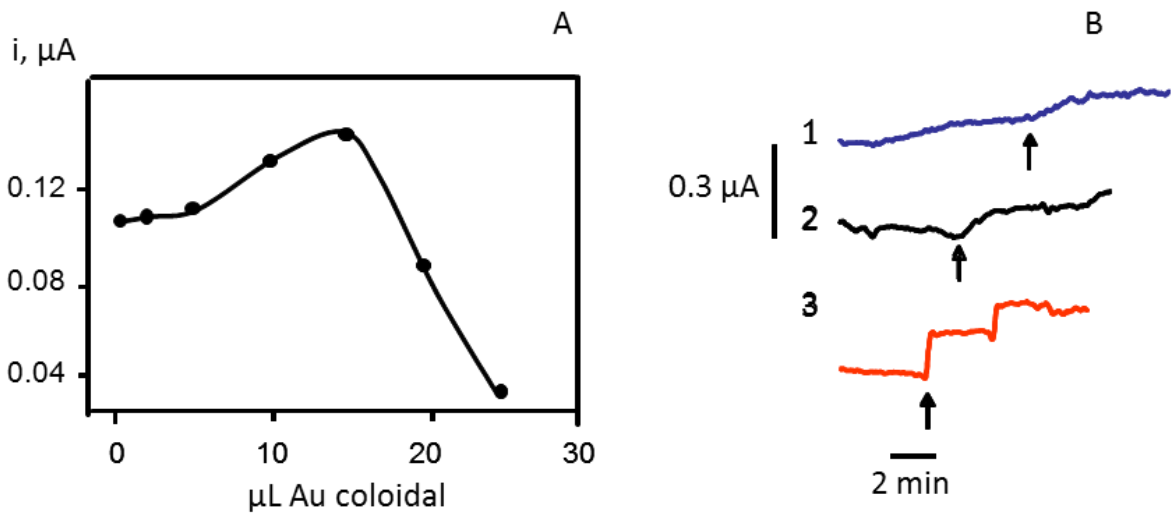


Figura 65.- (A) Influencia del volumen de suspensión de oro coloidal en la corriente de oxidación de NADH sobre el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE. (B) Amperogramas de etanol sobre: ADH/PEDOT/SPAuE (1); ADH/PEDOT/SPCE (2); ADH/PEDOT/ AuNPs/SPCE (3). Preparación del biosensor: 40 μL EDOT, 0.03 M y 90 U/μL ADH en BMIMPF₆; E = +600 mV; t=5 min. Medida: NAD⁺ 3 mM; etanol 0.1 mM; PBS 0.1 M pH 7.4; E_{det} = +300 mV

-Influencia del potencial y del tiempo de electropolimerización

Debido a que la enzima ADH se inmoviliza por atrapamiento en la matriz polimérica durante la etapa de deposición electroquímica de PEDOT, se estudió la influencia de las dos variables que influyen en esta etapa: el potencial de polimerización aplicado a la disolución del monómero EDOT y el tiempo de aplicación de dicho potencial. En la Figura 66 (izda.) se han representado los resultados obtenidos al medir la respuesta de oxidación del NADH generado tras la adición de etanol 0.1 mM, sobre biosensores preparados por aplicación de distintos valores de potencial entre 0 y 1000 mV a electrodos AuNPs/SPCE sobre los que se depositaban cada vez 40 μL de una disolución de EDOT 0.03 M y 2.25 U/ μL ADH en BMIMPF₆. Como puede observarse, la corriente más alta se obtuvo cuando se aplicó un potencial de +600 mV. Este potencial es menor que el utilizado para la preparación del electrodo PEDOT/AuNPs/ SPCE (+800 mV), debido a que a valores de potencial más positivos tiene lugar la degradación de la enzima. Por otra parte, la influencia del tiempo de aplicación del potencial anterior se optimizó estudiando el intervalo comprendido entre 2 y 15 min, encontrándose (Figura 66 dcha.) un valor óptimo para 5 min, tiempo a partir del cual la respuesta decae rápidamente.

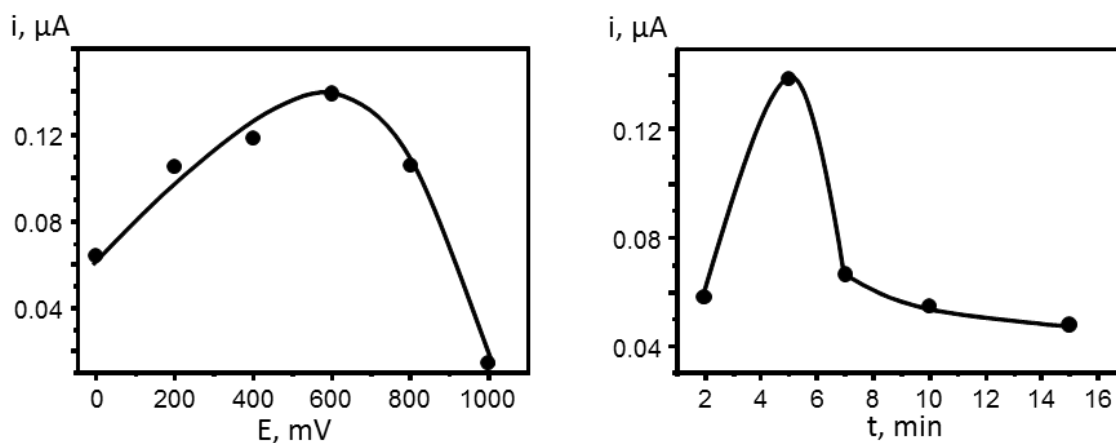


Figura 66.- Influencia del potencial (izda.) y el tiempo (dcha.) de electropolimerización de EDOT sobre el electrodo AuNPs/SPCE (otras condiciones como en la Figura 65).

-Influencia de la cantidad de enzima ADH

En las condiciones optimizadas anteriormente se estudió la influencia de la cantidad de ADH inmovilizada en la superficie del biosensor, preparando distintos electrodos por electropolimerización de disoluciones de EDOT 0.03 M en BMIMPF₆, que contenían además diferentes concentraciones de enzima en el intervalo comprendido entre 0 y 135 U/μL. En la Figura 67 se muestran los resultados obtenidos, apreciándose un valor máximo de corriente para una concentración de 90 U/μL de ADH.

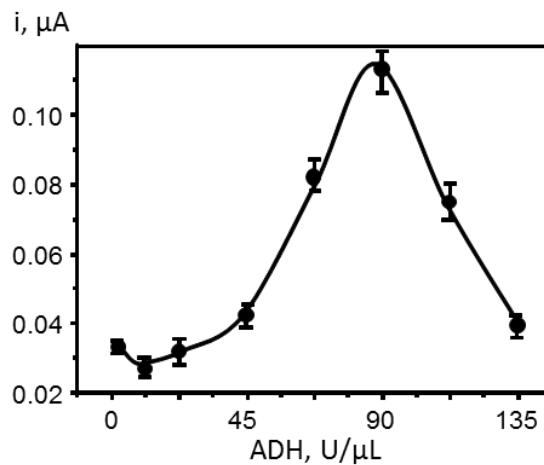


Figura 67.- Influencia de la concentración de ADH inmovilizada por atrapamiento sobre el electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE (otras condiciones como en la Figura 65).

Como puede verse, concentraciones superiores de enzima dan lugar a una disminución brusca de la señal, debido probablemente al impedimento a la transferencia electrónica que origina la presencia de una cantidad relativamente elevada de biomolécula aislante.

-Influencia de la concentración de NAD⁺

Una vez optimizadas las variables implicadas en la preparación del biosensor, se estudió el efecto que las condiciones experimentales de la disolución de medida ejercen sobre la respuesta electroquímica. En primer lugar, el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE se utilizó para medir disoluciones de etanol que contenían además diferentes concentraciones de NAD⁺ en el intervalo comprendido entre 1.0 y 5.0 mM. Como puede verse en la Figura 68, la corriente en estado estacionario aumenta rápidamente con la concentración de NAD⁺ hasta un valor 3 mM, debido a la mayor eficiencia de la conversión en exceso de cofactor. Sin embargo, concentraciones excesivas producen un efecto inhibitorio [Chakraborty, 2007], que se traduce en una apreciable disminución de la corriente. De acuerdo con estos resultados, se eligió la concentración citada como más apropiada para la determinación de etanol con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE.

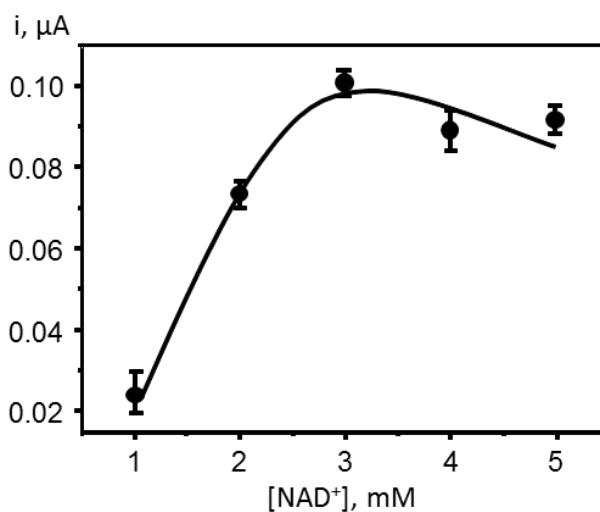


Figura 68.- Influencia de la concentración de NAD⁺ en la disolución de medida (otras condiciones como en la Figura 65).

-Influencia del pH

Para realizar este estudio se midieron disoluciones preparadas a diferentes valores de pH comprendidos entre 4.0 y 9.0, empleando para su ajuste disoluciones reguladoras fosfato 0.1 M. La Figura 69 muestra un aumento rápido de la corriente en el intervalo de pH 6.0 a 7.4, con un máximo en este último valor y un decrecimiento brusco a partir del mismo. Esta disminución de la corriente se debe probablemente a la baja estabilidad del NAD^+ a pH alcalino [Manesh, 2008]. Por tanto, el valor de pH 7.4 se consideró óptimo para la detección de etanol con el biosensor de ADH desarrollado.

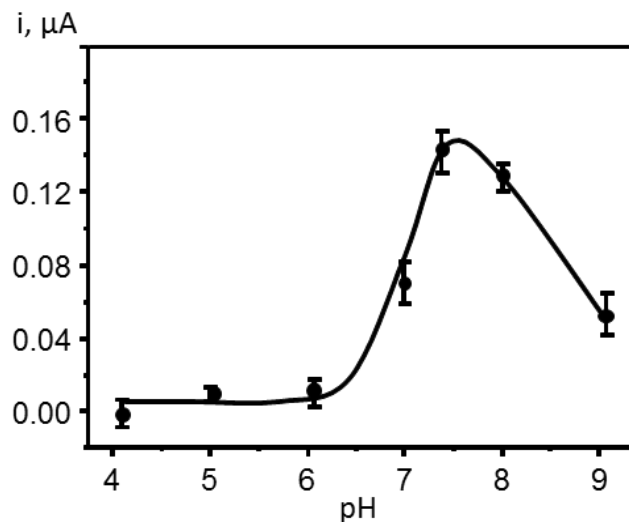


Figura 69.- Influencia del pH sobre la corriente en estado estacionario obtenida con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE (otras condiciones como en la Figura 65).

-Influencia del potencial de detección

Se estudió la influencia del potencial de detección aplicado al bioelectrodo ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE en el intervalo de 0 a 500 mV. Como se aprecia en la Figura 70, a medida que aumenta el potencial aplicado, la magnitud de la respuesta del NADH formado en la reacción enzimática aumenta hasta alcanzar un máximo a + 300 mV, valor que coincide con el potencial de detección del electrodo PEDOT/AuNPs/SPCE.

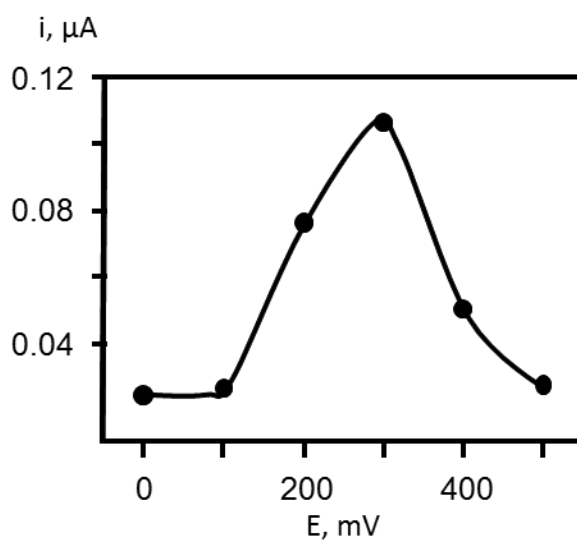


Figura 70.- Influencia del potencial aplicado en las señales amperométricas sobre ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE.

Como resumen de los estudios de optimización realizados, en la Tabla 23 se muestran las variables estudiadas, los intervalos correspondientes y los valores elegidos como óptimos.

Tabla 23.- Condiciones experimentales óptimas de preparación y funcionamiento del biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE.

Variable	Intervalo	Valor óptimo
Cantidad de AuNPs, μL	2 - 25	15
Concentración de EDOT, M	-	0.03
Medio electropolim.	-	BMIMPF ₆
Tiempo electropolim., min	0 - 15	5
Potencial electropolim, mV	0 - 1000	600
Concentración de ADH, U/ μL	0 - 135	90
Concentración de NAD ⁺ , mM	1 - 5	3
pH	4 - 9	7.4
Potencial de detección, mV	0 - 500	300

Finalmente, en la Figura 71, a modo de comparación, se han representado los voltamperogramas cíclicos del sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$ obtenidos sobre el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE y sobre el electrodo preparado en ausencia de enzima, observándose una respuesta equivalente, aunque la corriente de los picos anódico y catódico es notablemente inferior sobre el biosensor debido a la presencia de la enzima.

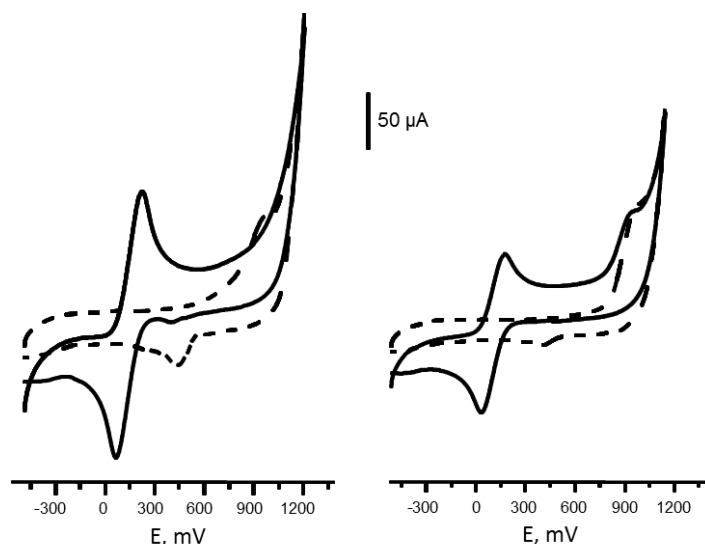


Figura 71.- Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre: (izda.) PEDOT/AuNPs/SPCE; (dcha.) ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE; $v = 50$ mV/s; (- - -) KCl 0.1 M.

5.2.1.6. Determinación de etanol y características analíticas

En las condiciones de medida previamente optimizadas, se obtuvo el calibrado para la determinación de etanol cuyas características analíticas se resumen en la Tabla 24. El intervalo lineal de concentraciones de etanol está comprendido entre 5 y 100 μM ($r = 0.9992$). El límite de detección se calculó aplicando el criterio de $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado y s_b es la desviación estándar ($n=10$) de las medidas de disoluciones de etanol 5 μM , obteniéndose una concentración 0.1 μM (LOD), y un límite de cuantificación ($10s_b/m$), igual a 6.7 μM .

Estas características se han comparado con las de otras configuraciones recientes de biosensores electroquímicos de etanol basados en ADH, empleando métodos de inmovilización no covalentes de la enzima (ver Tabla 9 de la Introducción). De esta comparación puede concluirse que el biosensor desarrollado hace posible utilizar un potencial de detección relativamente bajo, en ausencia de mediador, obteniéndose un amplio intervalo lineal y un límite de detección que se encuentra entre los más bajos de los biosensores descritos en la bibliografía.

Tabla 24.- Características analíticas del método para la determinación de etanol

Característica	Valor
Intervalo lineal, μM	5 - 100 ($r = 0.9995$)
Pendiente, $\mu\text{A}/\text{M}$	727 ± 8
Ordenada en el origen, nA	11.3 ± 0.4
Límite de detección, μM	0.1
Límite de cuantificación, μM	6.7
RSD, % ($n= 10$)	2.6

5.2.1.7. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad del método de determinación de etanol con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE se ha evaluado mediante comparación de las corrientes en estado estacionario de los amperogramas obtenidos por medida de disoluciones de etanol 0.1 mM en días diferentes, empleando diez biosensores distintos preparados de la misma manera. Los resultados obtenidos proporcionaron una desviación estándar relativa del 4.9 %, valor que pone de manifiesto la buena precisión del procedimiento de preparación del biosensor.

Por otro lado, aunque la configuración del bioelectrodo desarrollado, construido sobre un electrodo serigrafiado, y la facilidad del método de preparación empleado, hacen posible su uso como dispositivo desechable, se evaluó el tiempo de vida de este diseño, realizando medidas repetidas de disoluciones de etanol 50 μM con un único biosensor. Se comprobó que, después de 30 medidas, la corriente permanecía al 83% del valor de la respuesta inicial.

5.2.1.8. Parámetros cinéticos

Al igual que en los biosensores anteriores, para determinar los parámetros cinéticos de esta configuración, se comprobó primero el ajuste de su comportamiento al modelo de Michaelis-Menten. Para ello, se calculó el parámetro "x" de la ecuación de Hill, cuyo valor resultó ser igual a 0.96. Este resultado demuestra el buen ajuste a dicho modelo.

Los valores de la constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}) se calcularon utilizando la representación de Lineweaver-Burk para adiciones de etanol desde 5 μM hasta 3 mM. A partir de los resultados obtenidos, los valores de $1/i$ frente a $1/[\text{fenol}]$ proporcionaron una línea recta, de ecuación: $y = 4.2 + 0.63 x$ ($r = 0.993$). Este resultado proporcionó un valor de $V_{\max} = 0.24 \mu\text{A}$ y de $K_M^{ap} = 0.15 \text{ mM}$. Cabe destacar que la constante de Michaelis-Menten obtenida es significativamente menor que otros valores encontrados en la bibliografía (ver Tabla 9 de la Introducción). Esto pone de manifiesto la alta afinidad de la enzima por el sustrato en el

microambiente que proporciona el polímero electrodepositado sobre el electrodo serigrafado modificado con nanopartículas de oro.

5.2.1.9. Aplicación a la determinación de etanol en cerveza

El biosensor desarrollado se aplicó a la determinación de etanol en dos tipos de cervezas sin alcohol: una comercial, marca Buckler, con un contenido de etanol etiquetado como <1 vol%, y un material de referencia (BCR-651) certificado, con una concentración del 0.505% de etanol. El procedimiento utilizado para la determinación se ha descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.4.1.). Como resumen, en la Figura 72 se ha representado un esquema del mismo.

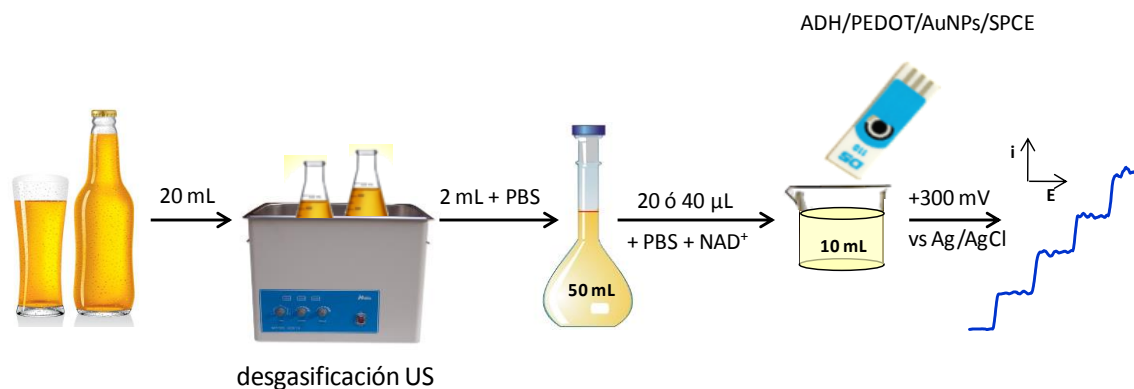


Figura 72.- Esquema del procedimiento de determinación de etanol en cerveza con el biosensor ADH/PEDOT/AuNPs/SPCE.

Para la determinación, una vez diluida la muestra en la etapa final con el electrólito soporte, se aplicó el método de adiciones patrón con el fin de evitar un posible efecto matriz. La concentración media de etanol en la muestra de referencia fue 0.50 ± 0.06 % ($n = 5$) valor que coincide apreciablemente con el certificado. Por otro lado, la concentración media encontrada en la muestra de cerveza comercial fue 0.96 ± 0.08 % ($n = 5$), valor muy próximo al esperado, según el dato que parece en la etiqueta. Estos resultados demuestran la utilidad del biosensor para el análisis de muestras reales que contienen una baja concentración de etanol.

5.2.1.10. Preparación del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE

El procedimiento de preparación del biosensor de tirosinasa se ha presentado en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.1.3.). Dicho procedimiento es similar al descrito anteriormente para el biosensor de ADH, atrapando la enzima en la red de PEDOT electrogenerado sobre el AuNPs/SPCE por aplicación del potencial de electrodeposición adecuado. En este caso, el método se optimizó empleando fenol como sustrato de la reacción enzimática. Dicha reacción (Figura 73) conduce a la formación de quinona cuya señal de reducción se mide sobre el biosensor.

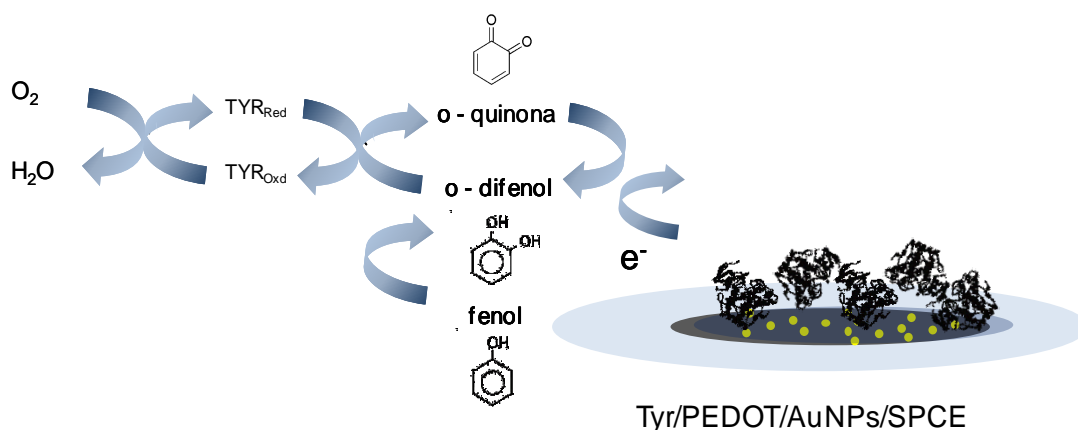


Figura 73.- Esquema de la preparación y funcionamiento del biosensor ADH/PEDOT/nAu/SPCE.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se procedió a estudiar la influencia de las variables que afectan específicamente a la preparación y el funcionamiento del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE. En primer lugar, utilizando la cantidad de oro coloidal optimizada previamente, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas sobre el biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE con las correspondientes a los bioelectrodos preparados en ausencia de nanopartículas de oro (Tyr/PEDOT/SPCE) y sobre un electrodo serigrafiado de oro modificado con PEDOT (Tyr/PEDOT/SPAuE).

Como puede apreciarse en la Figura 74, al potencial de detección utilizado, la adición de fenol sobre el bioelectrodo nanoestructurado da lugar a corrientes en estado estacionario bien definidas, mientras que sobre el electrodo Tyr/PEDOT/SPCE únicamente se obtiene una pequeña respuesta, aproximadamente de un 13% de la corriente anterior, y más lenta, no apareciendo señales medibles cuando se utiliza el biosensor preparado sobre el electrodo serigrafiado de oro. Estos resultados demuestran la utilidad del electrodo Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE para la preparación de un biosensor de tirosinasa.

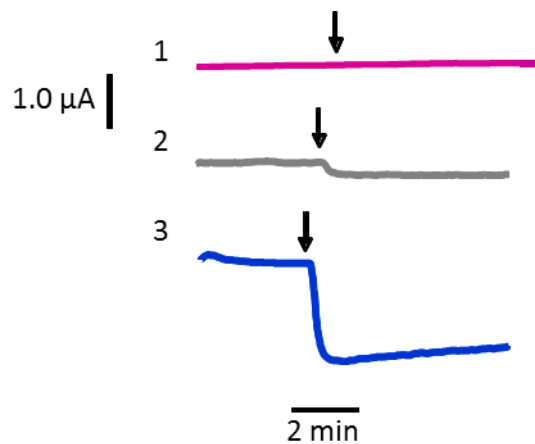


Figura 74.- Amperogramas de fenol sobre: Tyr/PEDOT/SPAuE (1); Tyr/PEDOT/SPCE (2); Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE (3). Preparación del biosensor: $40 \mu\text{L}$ EDOT, 0.03 M y $100 \text{ U}/\mu\text{L}$ Tyr en BMIMPF_6 ; $E = +200 \text{ mV}$; $t = 5 \text{ min}$. Medida: fenol $50 \mu\text{M}$; PBS 0.1 M pH 7.4 ; $E_{\text{det}} = -150 \text{ mV}$.

-Influencia del potencial y del tiempo de electropolimerización

El potencial de electrogeneración del polímero para la preparación del biosensor TYR/PEDOT/nAu/SPCE se estudió en el intervalo de 0 a 1000 mV, evaluando la respuesta electroquímica correspondiente a la adición de fenol sobre disoluciones agitadas de PBS 0.1 M de pH 7.4 con los resultados que aparecen en la Figura 75A.

Puede observarse una disminución paulatina de la corriente a medida que el potencial de electropolimerización se hace más positivo, debido probablemente a que el atrapamiento de la enzima se ve dificultado cuando el crecimiento del polímero es más rápido. Además, como se ha señalado anteriormente, la aplicación de potenciales muy positivos pueden dar lugar a la degradación de la enzima. Por ello, con el fin de obtener una buena sensibilidad, se eligió un potencial de + 200 mV para la formación del biosensor de tirosinasa. Por otro lado, cuando se estudió el efecto del tiempo de electrodeposición aplicando dicho potencial (Figura 75B), se observó un rápido incremento de la corriente en el periodo comprendido entre 2 y 5 minutos. Posteriormente, para tiempos más largos, la intensidad disminuye ligeramente, por lo que se eligió un tiempo de 5 minutos como más apropiado para la preparación del biosensor.

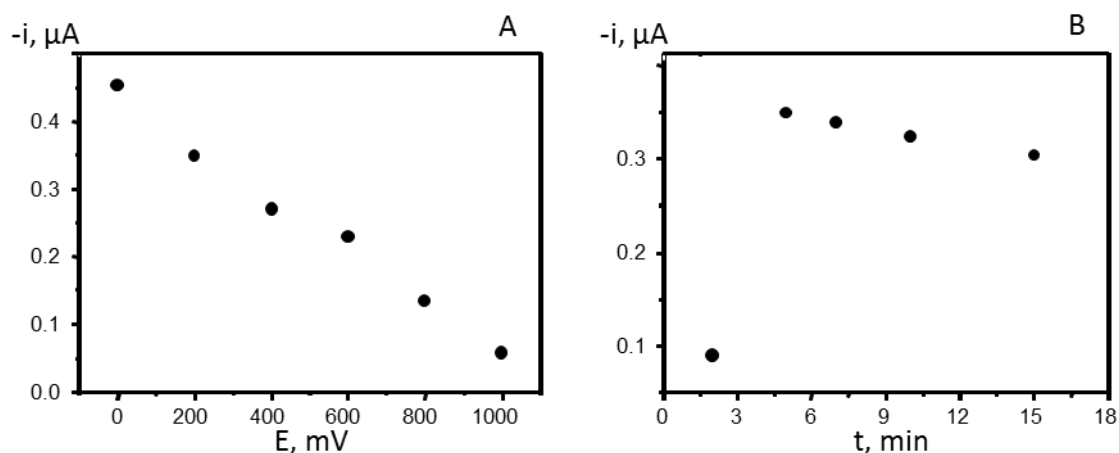


Figura 75.- A) Influencia del potencial y B) el tiempo de electropolimerización de EDOT sobre el electrodo AuNPs/SPCE (otras condiciones como en la Figura 65).

-Influencia de la cantidad de enzima Tyr

En las condiciones experimentales optimizadas, se estudió la influencia de la cantidad de tirosinasa presente en la superficie del biosensor sobre la respuesta electroquímica de fenol. Para ello, se prepararon diferentes electrodos por electropolimerización de disoluciones de EDOT 0.03 M en BMIMPF₆, que contenían además diferentes concentraciones de enzima en el intervalo comprendido entre 10 y 400 U/μL, y se utilizaron para medir disoluciones de fenol 5 μM. Los resultados representados en la Figura 76 muestran una zona en la que la corriente permanece prácticamente constante, entre 100 y 200 U/μL. Después, la señal decae ligeramente debido al carácter aislante de la biomolécula. Por ello, con el compromiso de alcanzar una buena sensibilidad con el menor consumo posible de enzima, se eligió una concentración de 100 U/μL como la más apropiada para la preparación del biosensor.

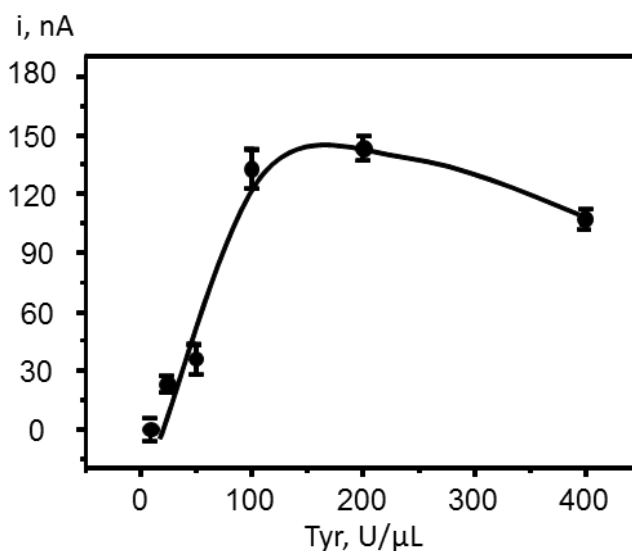


Figura 76.- Influencia de la concentración de Tyr inmovilizada por atrapamiento sobre el PEDOT/AuNPs/SPCE (otras condiciones como en la Figura 65)

-Influencia del potencial de detección

El potencial de detección a aplicar para las medidas con este biosensor debe ser suficientemente bajo como para permitir la reducción electroquímica de la quinona formada en la reacción enzimática del fenol en presencia de tirosinasa. Teniendo esto en cuenta, se estudió el efecto sobre la respuesta amperométrica del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE, de la aplicación de potenciales en el intervalo comprendido entre -300 y +200 mV vs Ag/AgCl. En la Figura 77 se han representado los resultados obtenidos, apreciándose un incremento de la corriente desde +200 a -150 mV, valor a partir del cual, la señal decae. Esta disminución de la respuesta a potenciales más negativos se atribuye a la polimerización de la o-quinona formada en la superficie del electrodo [Mena, 2007]. Por ello, se eligió un potencial de detección de -150 mV como más apropiado para estudios posteriores.

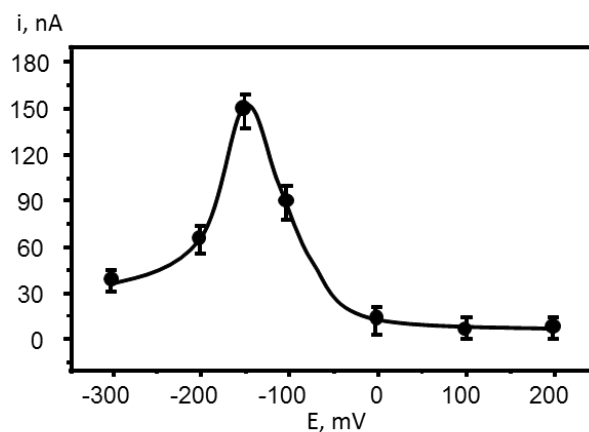


Figura 77.- Influencia del potencial aplicado en las señales amperométricas sobre Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE.

Una vez realizados los estudios de optimización, a modo de resumen, en la Tabla 25 se recogen las variables evaluadas junto a los intervalos correspondientes y los valores elegidos.

Tabla 25.- Condiciones experimentales óptimas de preparación y funcionamiento del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE

Variable	Intervalo	Valor óptimo
Cantidad de AuNPs, μL	-	15
Concentración de EDOT, M	-	0.03
Medio electropolim.	-	BMIMPF ₆
Tiempo electropolim., min	2 - 15	5
Potencial electropolim, mV	0 - 1000	200
Concentración de Tyr, U/ μL	10 - 400	100
pH	-	7.4
Potencial de detección, mV	-300 - +200	-150

Por otro lado, en la Figura 78 se comparan los voltamperogramas cíclicos del sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$ obtenidos sobre el biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE y sobre el electrodo preparado en ausencia de enzima. Al igual que ocurría en el caso del biosensor de ADH, en este caso se observa también que ambas respuestas son equivalentes, aunque la corriente de los picos anódico y catódico es notablemente inferior sobre el biosensor debido a la presencia de la enzima.

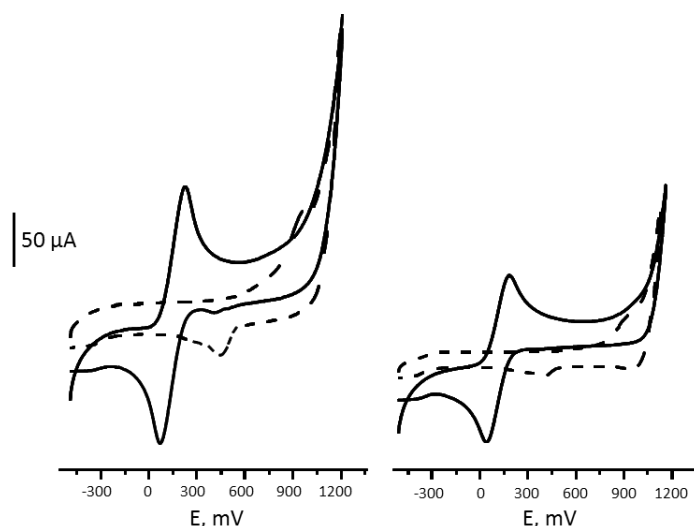


Figura 78.- Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre: (izda.) PEDOT/AuNPs/SPCE; (dcha.) Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE; $v = 50$ mV/s; (- - -) KCl 0.1 M

Finalmente, los espectros de impedancia de los electrodos PEDOT/AuNPs/SPCE y Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE (Figura 79) revelan un comportamiento de capacitor ideal para el primer electrodo, así como una notable resistencia a la transferencia electrónica por parte del biosensor de tirosinasa, que demuestra la eficacia del método de inmovilización de la enzima.

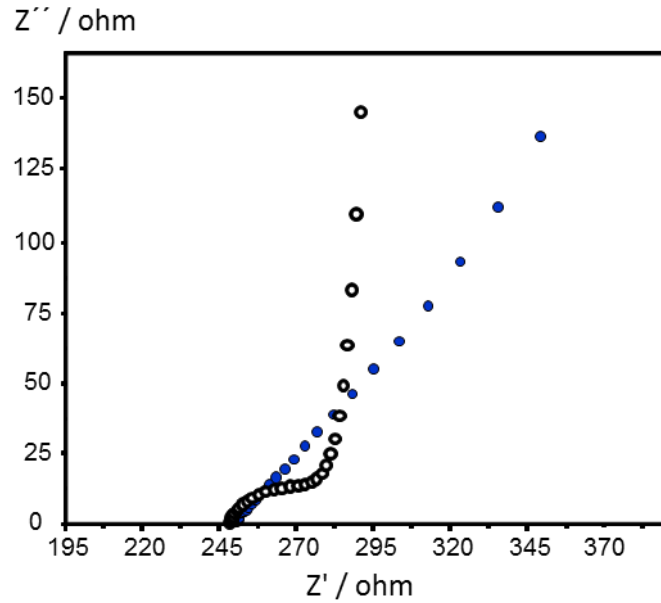


Figura 79.- Diagramas de Nyquist: (azul) PEDOT/AuNPs/SPCE; (blanco) Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M.

5.2.1.11. Determinación de fenol y características analíticas

En las condiciones experimentales optimizadas previamente se obtuvo un calibrado para la determinación de fenol con las características analíticas que se resumen en la Tabla 26. Como puede verse, el intervalo lineal se extiende en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 50 μM ($r = 0.997$). Al igual que en el biosensor anterior, el límite de detección se calculó aplicando el criterio de $3s_b/m$, donde m es la pendiente del calibrado y s_b es la desviación estándar ($n=10$) de las medidas de disoluciones de etanol 5 μM , obteniéndose una concentración 0.02 μM (LOD), y un límite de cuantificación ($10s_b/m$), igual a 0.07 μM .

En la Tabla 27 se han resumido las características analíticas de algunos métodos recientes para la determinación de fenol basados en biosensores electroquímicos de tirosinasa empleando métodos de inmovilización no covalentes de la enzima. De esta comparación pueden deducirse conclusiones análogas a las del biosensor de ADH. Entre otras, las más importantes son la obtención de un amplio intervalo de linealidad y de un límite de detección comparable a los más bajos encontrados en la bibliografía.

Tabla 26.- Características analíticas del método para la determinación de fenol

Característica	Valor
Intervalo lineal, μM	0.1 – 50 ($r=0.997$)
Pendiente, $\mu\text{A}/\text{mM}$	31.1 ± 0.6
Ordenada en el origen, nA	2 ± 2
Límite de detección, μM	0.02
Límite de cuantificación, μM	0.07
RSD, % ($n=10$)	1.5

5.2.1.12. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad del método de determinación de fenol con el biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE se ha evaluado mediante comparación de las corrientes en estado estacionario de los amperogramas obtenidos por medida de disoluciones de fenol 50 μM en días diferentes, empleando diez biosensores distintos. Los resultados obtenidos proporcionaron una desviación estándar relativa del 6.6 %, valor que pone de manifiesto una buena reproducibilidad en la construcción de los biosensores. Por otro lado, se evaluó el tiempo de vida de este diseño, realizando medidas repetidas de disoluciones de fenol 50 μM con un único dispositivo. Se comprobó que, después de 50 medidas, la corriente permanecía al 80% del valor de la respuesta inicial.

Tabla 27.- Características analíticas de algunos biosensores electroquímicos de Tyr para la determinación de fenol basados en la inmovilización no covalente de la enzima

Electrodo	Método	E_{det} , V	Intervalo lineal, mM	Pendiente, $\mu\text{A}/\text{mM}$	LOD, μM	Muestra	K_M^{ap} , mM	Ref.
AuNPs / GCE	Se modifica el GCE con AuNPs por inmersión en una suspensión de oro coloidal; el biosensor se prepara por adsorción de la enzima Tyr en la superficie del electrodo e inmersión en glutaraldehído	-0.1 vs Ag/AgCl	1 - 400	82	0.21	vinos	0.14	Carralero, 2005
AuNPs / grafito / teflón	Incorporación de la enzima Tyr a la mezcla de oro coloidal, grafito y teflón, y preparación de un bioelectrodo compuesto	-0.1 vs Ag/AgCl	0.025 – 4.0	540	0.02	aguas	0.0089	Carralero, 2006
ZnO / Chit / GCE	Se dispersan las nanopartículas de ZnO en chitosan, se añade la enzima y 5 μL de la mezcla se depositan en el electrodo	-0.2 vs SCE	0.15 - 65	182	0.05	-	0.023	Li, 2006a
MWCNTs / Nafion / GCE	La enzima y los nanotubos de carbono se dispersan en Nafion y 6 μL de la mezcla se incorporan a la superficie del electrodo.	-0.01 vs Ag/AgCl	1 - 19	303	0.13	-	0.052	Tsai, 2007a
Fe_3O_4 / Chit / GCE	Mezcla de nanopartículas de Fe_3O_4 con la enzima y el chitosan. Se depositan 10 μL de mezcla sobre el GCE y se evapora el disolvente.	-0.2 vs SCE	0.083 - 83	225	0.025	-	0.159	Wang, 2008
Fe_3O_4 / PDDA / MWCNTs / GCE	Se funcionalizan las nanopartículas de Fe_3O_4 con 1,6-hexanodiamina; se modifican los MWCNTs con PSS y PDDA; se mezclan ambos, y 10 μL de mezcla se depositan sobre el GCE. Se adsorbe la enzima y se entrecruza con glutaraldehído	-0.2 vs Ag/AgCl	10^{-5} – 0.039	516	0.005	E. coli	0.0586	Cheng, 2009
n-hidroxiapa-tito / Chit /AuE	Inmovilización de Tyr sobre nano-hidroxiapatito/chit depositado sobre un electrodo de oro	-0.2 vs SCE	10^{-5} – 0.007	56	<0.005	Agua residual	1.31	Lu, 2010

5.2.1.13. *Parámetros cinéticos*

El comportamiento del biosensor Tyr/PEDOT/AuNPs/SPCE para la determinación de fenol sigue el modelo de Michaelis-Menten, como demuestra el valor del parámetro "x" de la ecuación de Hill, igual a 1.04. Los valores de la constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}) se calcularon utilizando la representación de Lineweaver-Burk para adiciones de fenol hasta 100 mM. A partir de los resultados obtenidos, los valores de $1/i$ frente a $1/[fenol]$ proporcionaron una línea recta, de ecuación: $y = 0.62 + 0.015 x$ ($r = 0.992$). Este resultado proporcionó un valor de $V_{max} = 1.62 \mu A$ y de $K_M^{ap} = 0.025$ mM. Como puede verse (Tabla 27), el valor de la constante está entre los más bajos de los reportados en la bibliografía, probablemente debido a la alta afinidad de la enzima por el sustrato en las condiciones empleadas para la inmovilización, en presencia del polímero y las nanopartículas de oro.

5.2.1.14. *Conclusiones*

Las plataformas electroquímicas desarrolladas en este trabajo para la construcción de biosensores electroquímicos desechables combinan la posibilidad de utilizar líquidos iónicos puros como disolventes adecuados para la electropolimerización del monómero y el atrapamiento de las enzimas, con las propiedades ventajosas de los electrodos serigrafados modificados con nanopartículas de oro. El efecto sinérgico producido por estos materiales hace posible el diseño versátil de electrodos enzimáticos empleando enzimas de diferente naturaleza.

5.2.2. Inmunosensor sin marcador basado en un electrodo serigrafiado dual modificado con nanopartículas de oro y de PEDOT para la determinación simultánea de hormona del crecimiento (hGH) y prolactina (PRL)

En el capítulo anterior se demostró la utilidad del material compósito PEDOT/AuNPs para la preparación de biosensores electroquímicos de enzimas oxidasas y deshidrogenasas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en este trabajo se plantearon nuevos objetivos. En primer lugar, se sustituyeron las películas de PEDOT electrogeneradas por nanopartículas de polímero comerciales. Según se ha descrito en la bibliografía [Rajesh, 2009] (ver Introducción), los nanomateriales de polímeros conductores electrónicos (nanopartículas, nanoalambres y nanotubos) poseen un mejor comportamiento respecto a los materiales convencionales, debido fundamentalmente a que su área superficial expuesta es muy superior [Ramanavicius, 2005]. En esta aplicación se prepararon electrodos modificados con nanopartículas poliméricas y con nanopartículas de oro, empleando superficies serigrafiadas de carbono con MWCNTs adsorbidos con el fin de incrementar la sensibilidad de la detección.

Por otro lado, se consideró la posibilidad de utilizar la superficie electródica resultante como plataforma para la preparación de inmunosensores electroquímicos. Para ello se escogieron dos antígenos, la hormona del crecimiento humana (hGH) y la prolactina (PRL), inmovilizando los anticuerpos correspondientes: anti-hGH y anti-PRL sobre un electrodo serigrafiado dual modificado con nanopartículas de PEDOT y AuNPs. De esta forma, se obtuvo una configuración apropiada para la determinación simultánea de las dos especies. Como se ha visto en la Introducción, los niveles de hGH y PRL están mutuamente relacionados en algunos estados de interés clínico, por lo que la preparación de un inmunosensor múltiple para estas hormonas se considera una aplicación de gran utilidad en este ámbito.

Finalmente, para detectar la formación de los inmunocomplejos se diseñó una estrategia sin marcador, midiendo la disminución de la corriente de oxidación de la dopamina al aumentar la cantidad de antígeno sobre el inmunosensor.

5.2.2.1. Elección de la sonda electroquímica y de la superficie electródica

Para la preparación de un inmunosensor sin marcador es preciso elegir la especie electroactiva más apropiada para ser utilizada como sonda electroquímica que permita una detección sensible y selectiva del analito. Con este fin, se ensayaron tres especies: ferrocianuro, hidroquinona y dopamina. Las dos primeras se seleccionaron por ser mediadores redox habituales en este tipo de configuraciones, y la dopamina por la experiencia previa del equipo, que ya había observado un buen comportamiento electroquímico de este compuesto sobre plataformas electródicas análogas a la empleada en este trabajo [Marazuela, 1999]. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos se han representado en la Figura 80.

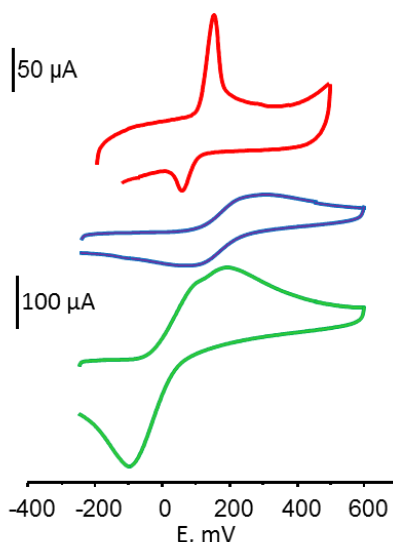


Figura 80.- Voltamperogramas cíclicos de: (rojo) dopamina, (azul) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, (verde) hidroquinona sobre AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE. Para disoluciones 0.5 mM en PBS 0.1 M pH 7.4

Puede observarse cómo, de las tres especies investigadas, la dopamina es la que muestra un voltamperograma mejor definido, con picos de oxidación y reducción a potenciales relativamente próximos entre sí. Considerando la elevada magnitud de la respuesta de oxidación de dicho compuesto, se eligió éste para la preparación del inmunosensor sin marcador.

En la Figura 81 se comparan los voltamperogramas cíclicos de la dopamina sobre distintos electrodos. Como puede verse, sobre los electrodos preparados en ausencia de PEDOT, es decir: AuNPs/MWCNTs/SPCE (curva 3) y MWCNTs/SPCE (curva 4), el comportamiento mostrado es menos reversible que sobre los electrodos modificados con nanopartículas de polímero, AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE (curva 1) y PEDOT/MWCNTs/SPCE (curva 2). Esta mejora de la transferencia de carga se atribuye a la capacidad del PEDOT de actuar como un mediador electrónico como consecuencia de su rica nube de electrones [Kumar, 2006]. Además, el polímero proporciona un ambiente hidrofóbico que favorece la oxidación reversible de la dopamina [Wen, 1999].

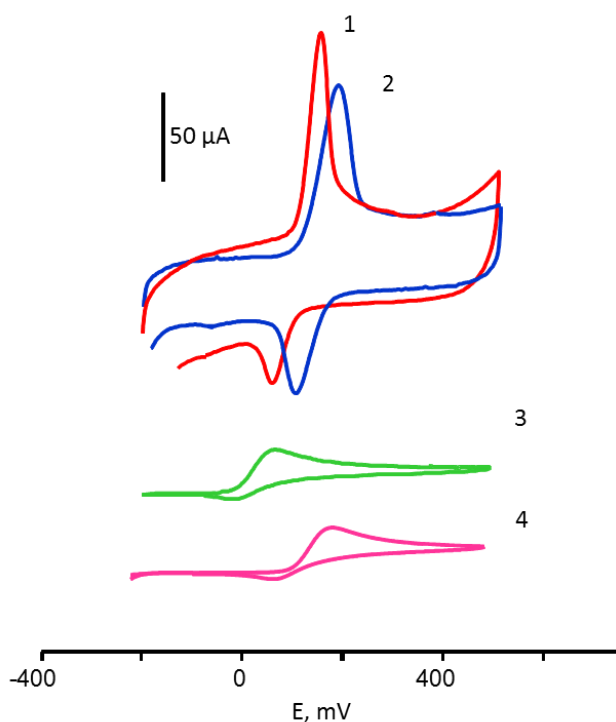


Figura 81.- Voltamperogramas cíclicos de dopamina 0.5 mM sobre: (1) AuNPs/PEDOT/MWCNTs/ SPCE; (2) PEDOT/MWCNTs/SPCE; (3) AuNPs/ MWCNTs/SPCE; (4) MWCNTs/SPCE; PBS 0.1 M pH 7.4; $v = 50$ mV/s

Por otro lado, la incorporación de las nanopartículas de oro al electrodo PEDOT/MWCNTs/SPCE, da lugar a un ligero desplazamiento de los picos anódico y catódico de la dopamina hacia valores menos positivos, así como también a un incremento de la corriente de oxidación. Así, los valores de dichos potenciales de pico fueron 153 y 64 mV, respectivamente, sobre el electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE, mientras que éstos aparecen a 200 y 109 mV sobre el electrodo PEDOT/MWCNTs/SPCE, con una misma diferencia $E_{pa} - E_{pc} \approx 90$ mV para ambas superficies modificadas. Además, las corrientes del pico de oxidación sobre estos electrodos fueron 108 μ A y 92 μ A, respectivamente. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que a pH 7.4, la dopamina está cargada positivamente ($pK_{a1} = 8.81$ [Armstrong, 1976], y puede adsorberse y ser atraída electrostáticamente sobre las nanopartículas de oro estabilizadas en medio citrato. La forma más aguda del pico de oxidación observado sobre el electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE está de acuerdo con esta explicación.

5.2.2.2. Optimización de las variables implicadas en la preparación del electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE

Como se ha explicado, la modificación electródica se realizó sobre superficies serigrafiadas de carbono con nanotubos de carbono adsorbidos (MWCNTs/SPCEs), sobre los que se incorporaron las nanopartículas de PEDOT y las AuNPs (ver Figura 25. de la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.1)). Para la preparación de los MWCNTs/SPCEs se emplearon nanotubos de carbono de pared múltiple previamente carboxilados por tratamiento con ácido nítrico a reflujo. Basándonos en experiencias previas del grupo [Agúí,2007a], se depositaron cada vez 2 μ L de suspensión de nanotubos en dimetilformamida, de 0.5 mg/mL, sobre la superficie del electrodo serigrafiado, secando a continuación bajo radiación IR. Una vez preparados los MWCNTs/SPCEs, la optimización de las variables experimentales se realizó investigando la respuesta de oxidación de disoluciones de dopamina 0.5 mM sobre el electrodo modificado.

-Influencia de la cantidad de PEDOT

Para realizar este estudio, se evaluó la señal analítica obtenida sobre distintos electrodos serigrafiados individuales ($A = 12.56 \text{ mm}^2$) preparados con diferentes volúmenes de suspensión de nanopartículas de PEDOT al 1%, en el intervalo de 0 a 10 μL . Como puede verse (Figura 82), la corriente de mayor magnitud se obtuvo para la menor cantidad de polímero ensayada, es decir, la correspondiente a 1 μL de suspensión. Esto se debe probablemente a la disminución de la conductividad de la superficie del electrodo MWCNTs/SPCE al aumentar la cantidad de nanopartículas de PEDOT depositadas, dada a la menor conductividad del polímero respecto a los nanotubos de carbono. Por otro lado, tal como muestra la Figura 82, se observó una mayor reproducibilidad de las medidas voltamperométricas cuando el electrodo se modificaba con 2 μL de nanopartículas poliméricas, ($\text{RSD} = 2.8\%$, $n=3$), en lugar de 1 μL ($\text{RSD} = 16\%$, $n=3$). Esta diferencia se debe probablemente a un mejor recubrimiento de la superficie del electrodo en el primer caso. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió un volumen de 2 μL para la modificación del MWCNTs/SPCE. Este volumen pasó a ser de 0.7 mL cuando se utilizaron los electrodos serigrafiados duales, debido a la menor área de cada una de las superficies elípticas ($A = 5.6 \text{ mm}^2$) que forman dicho electrodo.

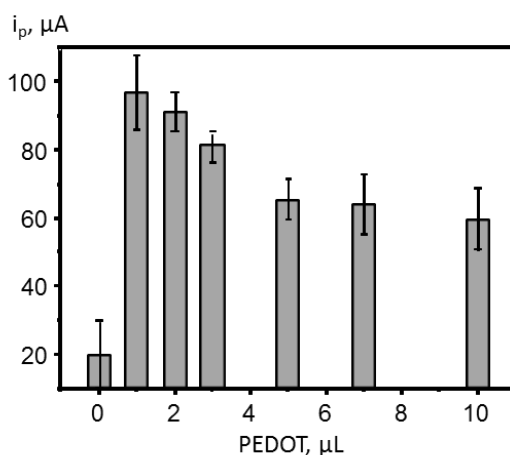


Figura 82.- Efecto de la cantidad de nanopartículas de PEDOT depositadas sobre el MWCNTs/SPCE en la respuesta voltamperométrica de dopamina 0.5 mM

-Influencia de la cantidad de AuNPs

Las nanopartículas de oro se adsorbieron sobre la superficie del electrodo PEDOT/MWCNTs/SPCE por inmersión del mismo en una suspensión de oro coloidal durante un periodo de tiempo medido exactamente. En este estudio se optimizó dicho tiempo evaluando la respuesta de oxidación de la dopamina sobre diferentes electrodos preparados por incubación entre 15 y 240 min.

Como puede observarse en la Figura 83, la corriente aumenta rápidamente hasta un tiempo de 60 min, disminuyendo después para periodos de tiempo más largos. Este comportamiento se explica teniendo en cuenta que una cantidad moderada de AuNPs favorece la adsorción de la dopamina cargada positivamente al pH de trabajo, al tiempo que aumenta la conductividad del electrodo resultante.

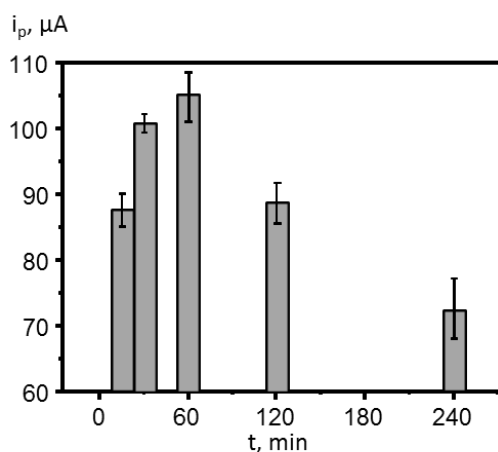


Figura 83.- Efecto del tiempo de incubación del electrodo PEDOT/MWCNTs/SPCE en la suspensión de oro coloidal sobre la respuesta voltamperométrica de dopamina 0.5 mM

Sin embargo, una cantidad excesiva de nanopartículas de oro probablemente bloquea parcialmente la superficie del electrodo originando al mismo tiempo un incremento de la capacitancia de la doble capa. Por ello, como solución de compromiso entre una alta sensibilidad un tiempo breve de análisis, se eligió un periodo de incubación de 30 min.

5.2.2.3. Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor dual para hGH y PRL

El esquema de la preparación y funcionamiento del inmunosensor dual aparece representado en la Figura 25 de la Parte Experimental. Como se ha dicho, se trata de una configuración sin marcador, en la que las variables a optimizar fueron las cantidades de los respectivos anticuerpos inmovilizados sobre cada superficie sensora, AuNPs/PEDOT/MWCNTs / SPCE1 y AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE2, y las condiciones de incubación en presencia de BSA, especie utilizada como agente bloqueante para evitar las adsorciones inespecíficas de los antígenos hGH y PRL. Para realizar estos estudios se observó la respuesta de oxidación de disoluciones de dopamina 0.5 mM mediante voltamperometría diferencial de impulsos.

-Influencia de las cantidades de anticuerpos anti-hGH y anti-PRL

En la Figura 84 se muestran los resultados obtenidos empleando diferentes inmunosensores preparados con 10 μL de disoluciones de anti-hGH o anti-PRL a concentraciones comprendidas entre 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$, en presencia de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de hGH o 1 $\mu\text{g/mL}$ de PRL. Como puede observarse, en el inmunosensor de hGH (barras grises), la diferencia de la corriente de pico en voltamperometría diferencial de impulsos respecto de la correspondiente al electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE, aumenta rápidamente con la concentración de anticuerpo hasta 30 $\mu\text{g/mL}$. La disminución posterior de la respuesta se atribuye a la menor eficiencia de inmovilización en presencia de una cantidad excesiva de anticuerpo. En el caso del inmunosensor de prolactina, la diferencia de corrientes aumenta también con la concentración de anti-PRL, aunque más lentamente, alcanzándose un máximo a 20 – 30 $\mu\text{g/mL}$ de biomolécula. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ para cada anticuerpo.

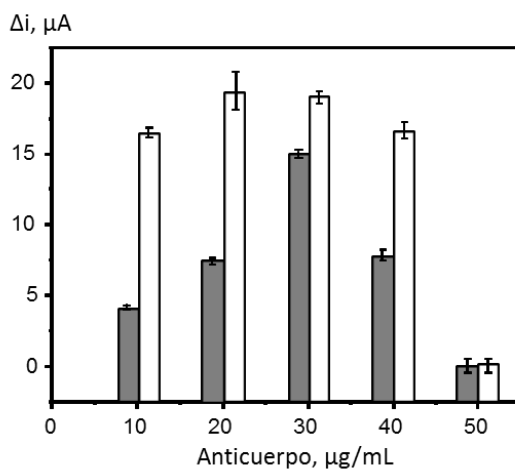


Figura 84.- Efecto de la concentración de anti-hGH (gris) o de anti-PRL (blanco) en la diferencia de corrientes de pico en DPV de dopamina 0.5 mM sobre cada inmunosensor respecto al electrodo AuNPs/PEDOT/CNTs/SPCE; 0.25 $\mu\text{g/mL}$ hGH; 1 $\mu\text{g/mL}$ PRL

-Influencia de la cantidad y el tiempo de incubación de BSA

Con el fin de evitar las adsorciones inespecíficas en ausencia de anticuerpos, se estudió el empleo de BSA como agente bloqueante midiendo, como en el caso anterior, la diferencia de corrientes del inmunosensor y el electrodo en ausencia de anticuerpos, con los resultados que se han representado en la Figura 85. Como puede observarse, en el intervalo de concentraciones de BSA estudiado, las mayores diferencias se encontraron utilizando porcentajes del 0.2 % (barras grises) y del 0.3 % (barras blancas) para hGH y PRL, respectivamente. Por tanto, una concentración intermedia, del 0.25 % de BSA, fue la elegida para la construcción del inmunisensor dual. Además, se observó que un tiempo de incubación de 30 min en la disolución de agente bloqueante era suficiente para lograr una eficiente minimización de las interacciones no deseadas.

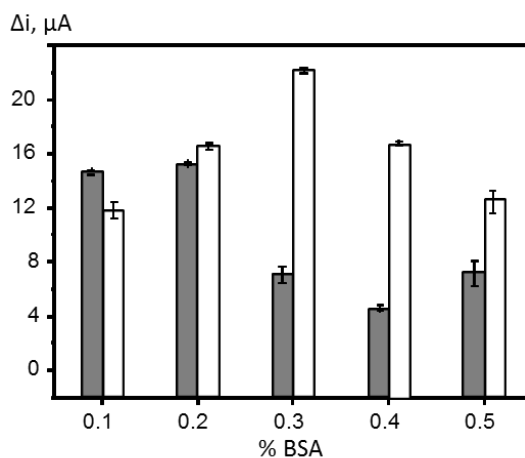


Figura 85.- Efecto de la concentración de BSA en la diferencia de corrientes de pico en DPV de dopamina 0.5 mM sobre el inmunosensor de hGH (gris) o de PRL (blanco) respecto al electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE: 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hGH; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRL

Como resumen, en la Tabla 28 se muestran los resultados de los estudios realizados, los intervalos evaluados y los valores óptimos elegidos para la preparación de los inmunosensores.

Tabla 28.- Condiciones experimentales óptimas de preparación y funcionamiento de los inmunosensores de hGH y PRL sobre el electrodo dual AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE.

Variable	Inmunosensor	Intervalo	Valor óptimo
Cantidad de MWCNTs, μL	hGH, PRL	-	0.7 de 0.5 mg/mL
Cantidad de PEDOT, μL	hGH, PRL	0 - 10	0.7 de 1 %
Tiempo de adsorción de AuNPs, min	hGH, PRL	15 - 240	30
Cantidad de anti-hGH, $\mu\text{g}/\text{mL}$	hGH	10 - 50	3 μL de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Cantidad de anti-PRL, $\mu\text{g}/\text{mL}$	PRL	10 - 50	3 μL de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Cantidad de BSA, %	hGH, PRL	0.1 - 0.5	0.25
pH	hGH, PRL	-	7.4
Potencial de detección, mV		0 - 500	300

5.2.2.4. Calibrados y características analíticas

En las condiciones optimizadas previamente, se obtuvieron los calibrados para la determinación de hGH y de PRL con los inmunosensores anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE1 y anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE2, respectivamente. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 86 junto a algunos de los voltamperogramas en diferencial de impulsos registrados para la elaboración de dichos calibrados. Además, en la Tabla 29 se han resumido las características analíticas de los métodos correspondientes.

Los intervalos lineales de concentración obtenidos para ambas hormonas, comprendidos entre 0.05 y 1000 ng/mL (hGH), y 0.001 y 1000 ng/mL (PRL), son más amplios que los encontrados en la bibliografía empleando otras configuraciones (ver Tablas 10 (hGH) y 12 (PRL) en la Introducción). Por ejemplo, utilizando un inmunosensor impedimétrico para hGH, se obtuvo un intervalo lineal de 0.003 a 0.1 ng/mL [Rezaei, 2009]. En otra aplicación reciente desarrollada por nuestro grupo se preparó un magnetoinmunosensor para PRL, cuyo intervalo lineal se extendía entre 10 y 2000 ng/mL [Moreno-Guzmán, 2011].

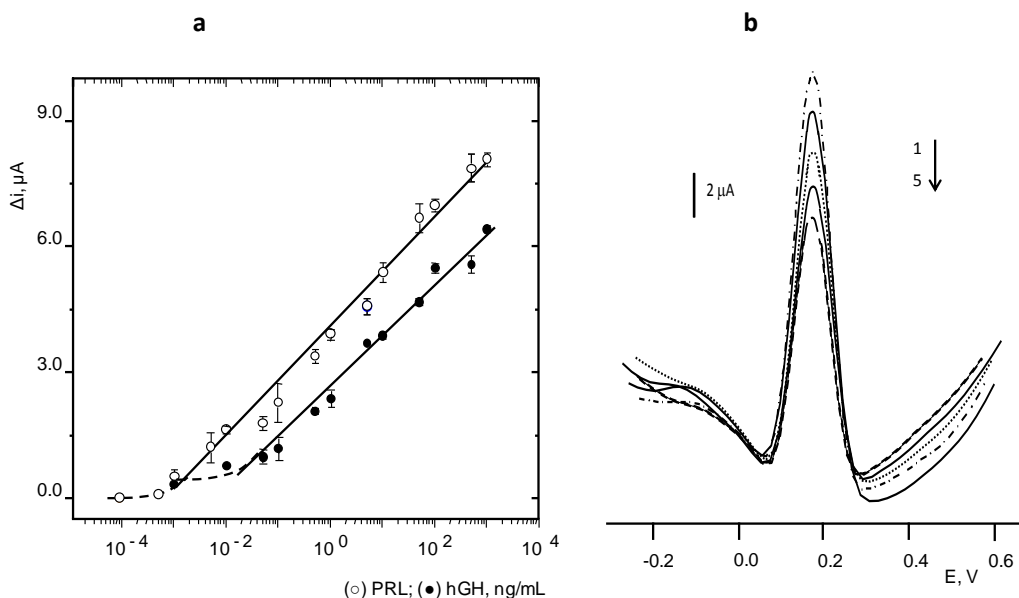


Figura 86.- (a) Calibrados para hGH (●) y PRL (○) obtenidos con el inmunosensor dual anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE1 y anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/ SPCE2; (b) voltamperogramas en DPV de (1), 0; (2), 1; (3), 10; (4), 100; (5), 1000 pg/mL PRL; dopamina 0.5 mM.

Los límites de detección se calcularon con el criterio $3s_b / m$, donde s_b es la desviación estándar ($n=10$) del cero de concentración, es decir, la corriente de pico de cada inmunosensor medida en ausencia de hGH o PRL. El valor encontrado para hGH, 4.4 pg/mL, es muy inferior al obtenido empleando un inmunosensor basado en la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR), 4 ng/mL [Treviño, 2009], y en cuanto al resultado obtenido para PRL, 0.22 pg/mL, este valor es más de 450 veces menor que el que presenta la configuración electroquímica anti-PRL/AuNP/poli-Lisina/GCE, utilizado un esquema tipo sándwich con poli(o-fenilendiamina)-AuNPs funcionalizadas con HRP-anti-PRL [Chen, 2012]. Probablemente, el buen comportamiento analítico que presenta el inmunosensor desarrollado en este trabajo se debe a la elevada sensibilidad con que se detecta la respuesta de oxidación de la dopamina sobre el electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE, esto unido a la eficiente inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie modificada con AuNPs.

Tabla 29.- Características analíticas de los métodos para la determinación de hGH y PRL con el inmunosensor dual anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE1 y anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE2.

Característica	hGH	PRL
Intervalo lineal, ng/mL	0.05 – 1000 ($r=0.991$)	0.001– 1000 ($r=0.992$)
Ecuación	$\Delta i, \mu A = 5.71 + 1.01 \log C(\text{ng/mL})$	$\Delta i, \mu A = 8.0 + 1.35 \log C(\text{ng/mL})$
Límite de detección, pg/mL	4.4	0.22
RSD, % ($n=5$) (el mismo día), para 1 ng/mL de ambas hormonas	3.5	2.7
RSD, % ($n=5$) (distintos días), para 1 ng/mL de ambas hormonas	4.0	4.8

5.2.2.5. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad de las señales voltamperométricas se evaluó obteniendo respuestas repetidas de disoluciones de hGH o PRL de 1 ng/mL en el mismo día con un mismo inmunosensor, o en días diferentes con distintos inmunosensores. En el primer caso, los valores de la desviación estándar relativa, 3.5 % (hGH) y 2.7% (PRL), pusieron de manifiesto la excelente repetibilidad de las medidas, mientras que los resultados obtenidos en el segundo caso, 4.0 % y 4.8 %, respectivamente, demostraron la buena precisión del método de preparación de los inmunosensores.

Finalmente, se evaluó el tiempo de vida de cada una de las plataformas desarrolladas, preparando el mismo día varios inmunosensores anti-hGH/AuNP/PEDOT/MWCNT/SPCE y anti-PRL/AuNP/PEDOT/MWCNT/SPCE que se conservaron en un refrigerador a 4°C. Después, cada uno de ellos se utilizó en diferentes días para medir las respuestas voltamperométricas de hGH y PRL en el intervalo de concentraciones comprendido entre 1 y 500 ng/mL. Para determinar la estabilidad de las señales analíticas se estableció en criterio de que éstas se situaran dentro del margen comprendido entre los límites $\pm 3s$, siendo s la desviación estándar de las medidas realizadas con cada inmunosensor el primer día de trabajo. Se observó el cumplimiento de esta condición durante 4 días en el caso de la hormona hGH, y durante 7 días en el caso de la PRL. Estos resultados se consideran aceptables, pudiendo atribuirse a las configuraciones diseñadas en el trabajo una estabilidad moderada, en la que influye el modo de inmovilización de los anticuerpos, simplemente adsorbidos sobre la superficie de los electrodos.

5.2.2.6. Estudio de interferencias

Una vez puesto a punto el método de determinación de hGH y PRL con el inmunosensor dual, se estudió el efecto de diferentes especies que pueden estar presentes junto a ellas en las muestras de interés. En primer lugar se consideraron otras hormonas: progesterona, cortisol, testosterona y hormona folículo estimulante (FHS), obteniéndose los voltamperogramas en diferencial de impulsos del inmunosensor en disoluciones de dopamina 0.5 mM y en presencia de 1 mg/mL de cada compuesto. Se observó que la diferencia de corriente era equivalente en

todos los casos a la obtenida en ausencia de hGH o de PRL, lo que permite deducir que no existe interferencia apreciable por parte de ninguna de las hormonas ensayadas. Este resultado se debe probablemente a la elevada selectividad de los anticuerpos utilizados para la preparación de los inmunosensores. Por otro lado, se investigó el efecto de los ácidos ascórbico (AA) y úrico (AU), especies habitualmente presentes en las muestras de fluidos biológicos, y que se oxidan electroquímicamente a potenciales relativamente bajos, lo que puede dar lugar a falsas respuestas. En la Figura 87 se comparan los voltamperogramas de la dopamina 0.5 mM sobre el electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE con los de estas especies, observándose la práctica ausencia de señal de oxidación a potenciales próximos al de la dopamina. Este resultado indica que no existe interferencia electroquímica en las condiciones de medida utilizadas. Probablemente, este resultado se debe al efecto de las nanopartículas de PEDOT, que favorecen la separación entre las señales de la dopamina, más hidrofóbica, y los ácidos ascórbico y úrico, cargados negativamente en las condiciones experimentales de trabajo [Kumar, 2005].

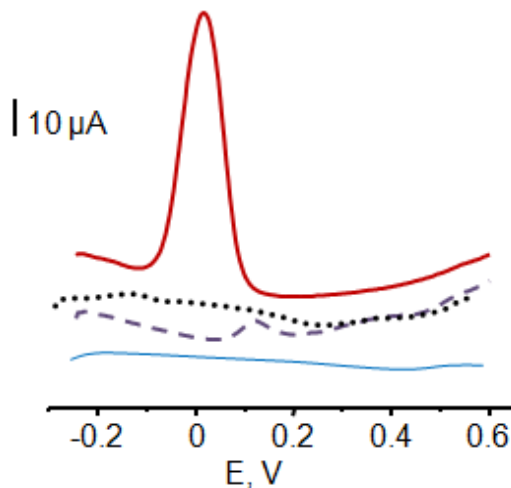


Figura 87.- Voltamperogramas en diferencial de impulsos sobre el electrodo AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE para: (—) dopamina 0.5 mM; (...) ácido úrico 84 µg/mL; (- -) ácido ascórbico 88 µg/mL; (—) electrolito soporte. PBS 0.1 M pH 7.4

Finalmente, se estudió la posible interferencia cruzada de cada hormona sobre el inmunosensor de la otra, registrando los voltamperogramas de dopamina 0.5 mM sobre el inmunosensor dual preparado con anti-PRL/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE1 en presencia de 100 ng/mL de hGH y con anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE2 en presencia de 100 ng/mL de PRL. En la Figura 88 se han representado los resultados obtenidos, observándose cómo las respuestas coinciden en ambos casos con los voltamperogramas de disoluciones de dopamina en ausencia de hGH o PRL. Esto demuestra que no tiene lugar interferencia cruzada entre ambas especies cuando se utiliza el inmunosensor preparado en las condiciones descritas.

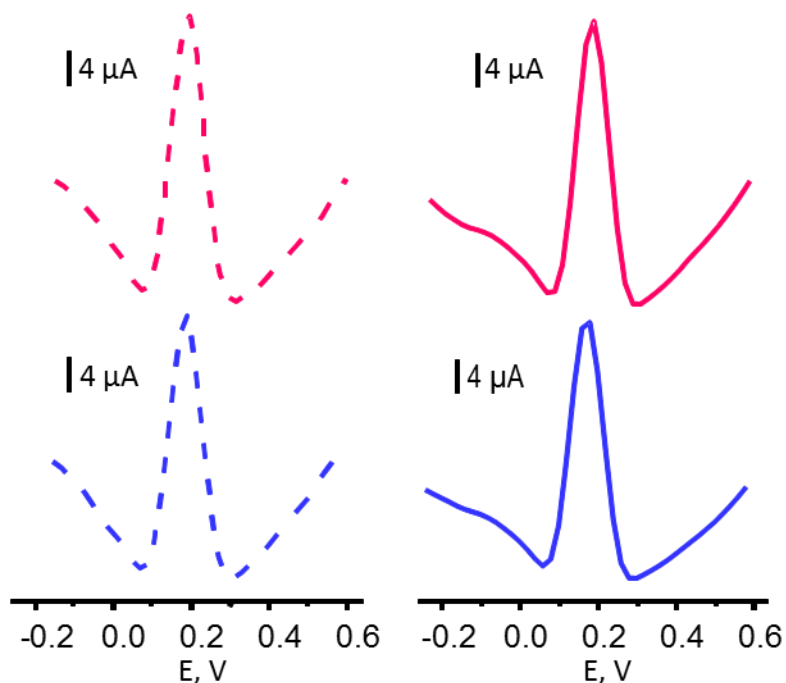


Figura 88.- Voltamperogramas en diferencial de impulsos para dopamina 0.5 mM sobre: (—) anti-hGH/AuNPs/PEDOT/MWCNTs/SPCE; (- - -) + 100 ng/mL PRL; (—) anti-PRL/AuNPs/ PEDOT/MWCNTs/ SPCE; (- - -) + 100 ng/mL hGH

5.2.2.7. Aplicación a la determinación simultánea de hGH y PRL en suero humano y saliva

La utilidad del inmunosensor dual para la determinación simultánea de ambas hormonas se demostró por aplicación al análisis de dos tipos de muestras: suero humano y saliva, ambas enriquecidas con estas especies a niveles de concentración fisiológicos. En primer lugar se aplicó el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6.4. de la Parte Experimental a muestras de suero reconstituido contaminado con 1, 20 y 50 ng/mL de hGH, así como con 1, 20 y 200 ng/mL de PRL, concentraciones que pueden encontrarse en este tipo de muestras [Takahashi, 1968; Souter, 2010]. Con el fin de comprobar la existencia de un posible efecto matriz, se obtuvieron los calibrados para las dos hormonas por dilución apropiada del suero, comparándose los valores de las pendientes con las de los calibrados de patrones. La aplicación del test t de Student para un nivel de significación de 0.05 demostró que los resultados obtenidos: $1.0 \pm 0.3 \mu\text{A}$ (hGH) y $1.37 \pm 0.01 \mu\text{A}$ (PRL) eran estadísticamente comparables a los de las ecuaciones de la Tabla 30, $1.01 \pm 0.01 \mu\text{A}$ y $1.35 \pm 0.05 \mu\text{A}$, respectivamente. Por tanto, debido a la ausencia de diferencias significativas entre las pendientes, pudo llevarse a cabo la determinación de las dos hormonas por interpolación de las señales analíticas en el respectivo calibrado de patrones. En la Tabla 30 se han recogido los resultados obtenidos, con recuperaciones comprendidas entre el 98 ± 2 y el $102 \pm 1 \%$ para hGH, y el 99 ± 1 y el $103 \pm 3\%$ para PRL.

Como se ha comentado, el inmunosensor dual se aplicó también al análisis de saliva. Se considera de gran interés esta aplicación, ya que este tipo de muestra posee algunas ventajas, entre las que cabe citar su grado de complejidad medio, y la posibilidad de su recogida de forma no invasiva y en un volumen apreciable (mililitros). Los resultados en este caso fueron similares a los anteriores. Las pendientes de los calibrados obtenidos por dilución de las muestras fueron $0.9 \pm 0.3 \mu\text{A}$ (hGH) y $1.3 \pm 0.1 \mu\text{A}$ (PRL), valores que nuevamente demostraron la ausencia de efecto matriz. De este modo, la determinación simultánea de hGH y de PRL a niveles de concentración de 0.5, 2.5 y 5.0 ng/mL (Tabla 30), proporcionó recuperaciones comprendidas entre el 97 ± 3 y el 101 ± 4 (hGH), y el 96 ± 1 y el $102 \pm 4 \%$ (PRL).

Todos estos resultados pusieron de manifiesto la utilidad del inmunosensor dual desarrollado para la determinación simultánea de hGH y PRL en fluidos biológicos.

Tabla 30.- Determinación simultánea de hGH y PRL con el inmunosensor dual.

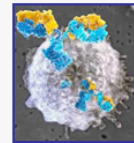
Puesto, ng/mL		Encontrado, ng/ mL		Recuperación, % *	
Suero					
hGH	PRL	hGH	PRL	hGH	PRL
1	1	1.0; 0.96; 0.98	1.0; 1.0; 1.1	98 ± 2	103 ± 3
20	20	19.7; 20.2; 19.9	19.9; 19.6; 19.6	100 ± 1	99 ± 1
50	200	50.4; 51.1; 51.0	198; 196; 197	102 ± 1	99 ± 1
Orina					
hGH	PRL	hGH	PRL	hGH	PRL
0.5	0.5	0.48; 0.52; 0.51	0.53; 0.49; 0.51	101 ± 4	102 ± 4
2.5	2.5	2.49; 2.42; 2.35	2.38; 2.41; 2.45	97 ± 3	96 ± 1
5.0	5.0	4.85; 5.25; 5.05	4.85; 5.25; 5.05	100 ± 3	101 ± 4

* ± ts/√n.

5.2.2.8. Conclusiones

En este trabajo se puso a punto un inmunosensor dual sin marcador preparado a partir de plataformas electrónicas serigrafiadas modificadas con nanotubos de carbono y nanopartículas de PEDOT y de oro. La configuración desarrollada permite la obtención de respuestas sensibles y selectivas de la dopamina, compuesto que puede utilizarse como sonda electroquímica para la determinación simultánea de dos hormonas: hGH y PRL. Las características analíticas del método fueron muy buenas, sobre todo a nivel de sensibilidad y selectividad, habiéndose demostrado también su aplicabilidad en distintos tipos de matrices biológicas. Finalmente, destacar que la ausencia de inmunorreactivos marcados permite simplificar la metodología de trabajo, que es más simple, rápida y económica que la de otros inmunosensores, lo que se considera de gran interés para un potencial uso de este diseño en el desarrollo de dispositivos de diagnóstico en el punto de atención.

**5.3. INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS
BASADOS EN MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
FUNCIONALIZADAS**



Ya se ha comentado en la Introducción de esta Memoria (Apdo. 3.1.2.), la enorme utilidad de las micropartículas magnéticas funcionalizadas (MBs) para la preparación de inmunosensores electroquímicos. Como se ha dicho, entre sus características destacan la versatilidad, la capacidad de inmovilización de una alta concentración de biomoléculas, la posibilidad de manipulación por aplicación de un campo magnético, y la de facilitar la realización precisa de las etapas de preparación del inmunosensor. El empleo de estas partículas, unido al de electrodos serigrafiados planos, están asociados comúnmente a la obtención de una elevada sensibilidad y la práctica ausencia de efecto matriz.

Por otro lado, también se ha explicado que la hormona del crecimiento (hGH), debido a sus múltiples efectos en el organismo, constituye desde hace algunos años una de las sustancias dopantes de mayor incidencia en el área de la medicina deportiva. La determinación de este compuesto se realiza habitualmente mediante cromatografía de gases, lo que supone un coste elevado si además, como ocurre en las grandes competiciones, es preciso analizar una elevada cantidad de muestras. Teniendo en cuenta que la mayor parte de estas muestras no contendrán hGH y que las muestras positivas contendrán una pequeña concentración de hormona, se consideró necesario poner a punto un método de cribado ("screening") de alta sensibilidad, que permitiera una determinación rápida y eficaz, ratificando posteriormente el resultado en el laboratorio.

Con la idea de construir un dispositivo adecuado para la determinación de bajas concentraciones de hormona del crecimiento (hGH), se desarrolló el magneto-inmunosensor que se presenta a continuación, en el que se emplearon micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo (TsMBs), capaces de enlazar covalentemente proteínas por sus grupos amino o sulfhidrilo. En este trabajo se describió por primera vez un inmunosensor electroquímico para hGH en el que, como se verá, la utilización de las TsMBs unido al establecimiento de un esquema de inmunoensayo de tipo sandwich y la detección mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV), proporcionó niveles de sensibilidad y un límite de detección apropiados para la determinación de esta hormona en muestras biológicas.

5.3.1. Magnetoinmunosensor para la determinación de hGH

En la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.2.) se describió el procedimiento de preparación del inmunosensor para la determinación de hGH, habiéndose ilustrado en la Figura 26. Brevemente (ver esquema simplificado en la Figura 89), en una primera etapa, el anticuerpo mAbhGH se unió covalentemente a las TsMBs incubándolo sobre una suspensión de las micropartículas en medio regulador fosfato 0.1 M, con agitación, a 37 °C. Se aplicó después una etapa de bloqueo con BSA y, a continuación, el conjugado mAbhGH-TsMBs se mantuvo en presencia de hGH, incubando el antígeno en las condiciones anteriores. Estas condiciones se aplicaron también a la incubación en presencia del anticuerpo pAbhGH y, finalmente, de un anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina, AP-anti-IgG. Una vez preparado, el conjugado AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs se suspendió en 49 μ L de una disolución de regulador Trizma de pH 9, transfiriéndose a la superficie de un electrodo serigrafiado de oro (SPAuE) sobre la que quedó inmovilizado con ayuda de un imán. Por último, la determinación se llevó a cabo añadiendo 1 μ L de disolución de 4-aminofenilfosfato (4-APP) 0.05 M sobre el electrodo y, tras 2 minutos de reacción, se registró un voltamperograma en SWV entre -600 y +800 mV.

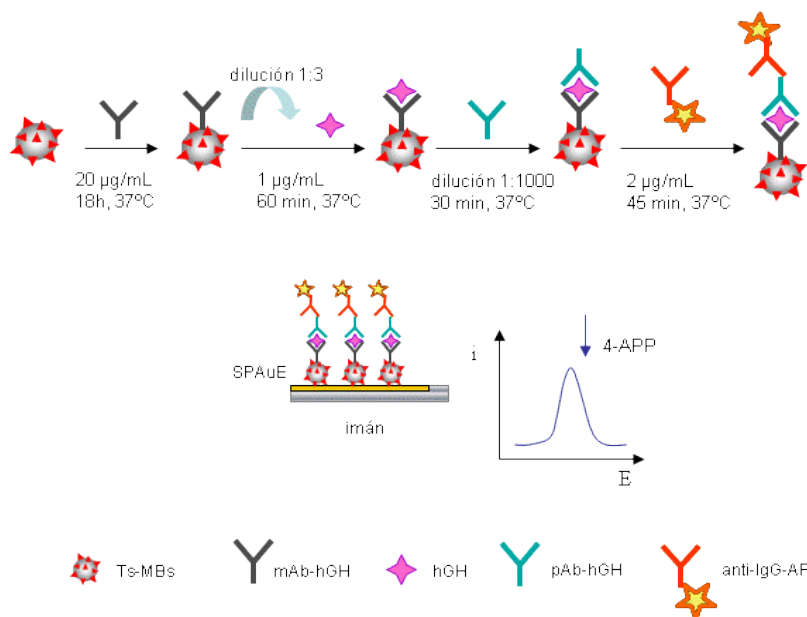


Figura 89.- Esquema simplificado de la preparación y funcionamiento del inmunosensor

5.3.1.1. Optimización de las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del inmunosensor

Debido a que en esta configuración se utiliza un anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina, en primer lugar se seleccionó el sustrato de la enzima más apropiado para llevar a cabo la determinación. Con este fin, se estudiaron las respuestas voltamperométricas de varios derivados fenólicos: fenol, 1-naftol y 4-aminofenol, que pueden aparecer como productos de la reacción enzimática a partir de sus respectivos derivados arilfosfato. Además, dichas respuestas se obtuvieron sobre electrodos serigrafados de distintos materiales: oro curado a baja temperatura (SPAuE BT), oro curado a alta temperatura (SPAuE AT) y carbono (SPCE), empleando en todos los casos un medio regulador Trizma de pH 9.0, en el que la enzima presenta la máxima actividad [Ito, 2000]. En la Figura 90 se han representado los voltamperogramas cíclicos obtenidos para una concentración 5 mM del derivado fenólico correspondiente.

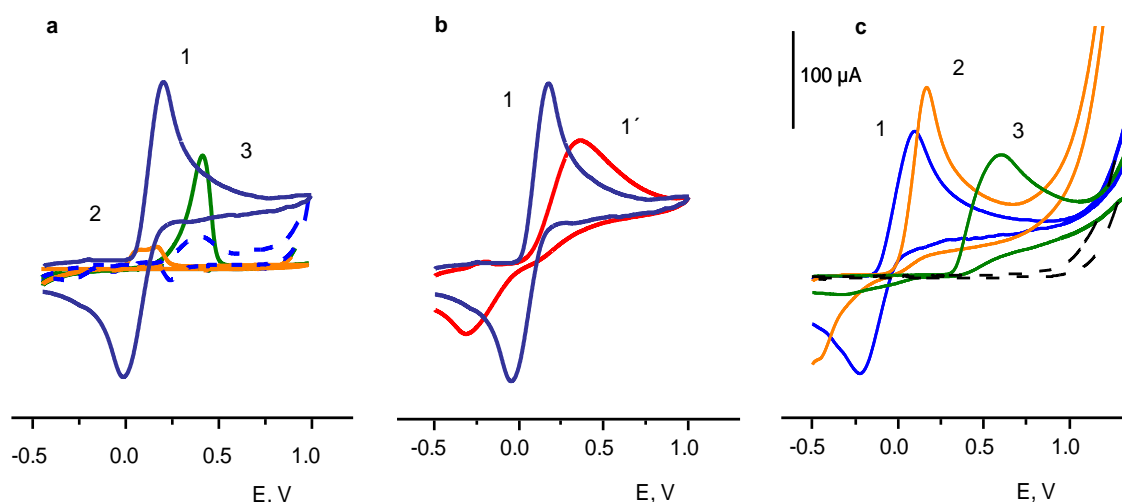


Figura 90.- Voltamperogramas cíclicos de (1, 1') 4-aminofenol, (2) 1-naftol y (3) fenol 5.0 mM, sobre: (a) SPAuE BT, (b) SPAuE AT, y (c) SPCE. (---) regulador Trizma 0.1 M de pH 9.0

Como puede apreciarse, el 1-naftol únicamente proporciona respuestas útiles sobre el electrodo de carbono (curva c2), mientras que el 4-aminofenol (1) exhibe voltamperogramas cuasi-reversibles tanto sobre los electrodos de oro (curvas a1 y b1) como sobre el de carbono (curva c1), con potenciales de pico menos positivos que los observados para dicho compuesto y para el fenol (curvas a3 y c3). Aunque el potencial del pico de oxidación del 4-aminofenol es

ligeramente más bajo sobre el electrodo de carbono (110 mV) que sobre el SPAuE BT (189 mV), la magnitud de la corriente de pico es un 25% mayor sobre el SPAuE BT, y la separación de los picos anódico y catódico es menor sobre dicho electrodo (229 mV) que sobre el SPCE (324 mV). Estos datos demuestran que el empleo de la superficie de oro mejora la respuesta electroquímica.

El estudio se completó evaluando el comportamiento voltamperométrico del 4-aminofenol sobre los dos tipos de electrodos serigrafados de oro empleados. Ambos se diferencian principalmente en el sustrato y la temperatura del curado de la tinta utilizados para su construcción [García-González, 2008]. El SPAuE BT está fabricado con un material polimérico sobre el que se aplica una temperatura de curado relativamente baja, 130 °C, mientras que el SPAuE AT se prepara a partir de un material cerámico, aplicándose entonces una temperatura de curado mucho mayor, 800 °C. Estas características originan diferencias en la morfología de la superficie de oro resultante, que afectan a las respuestas electroquímicas [García-González, 2008]. En la Figura 90b se comparan los voltamperogramas cíclicos del 4-aminofenol sobre los dos tipos de electrodos serigrafados de oro. Puede observarse cómo el electrodo SPAuE BT es el que proporciona un mejor comportamiento electroquímico y la mayor sensibilidad. Por tanto, fue elegido para la preparación del inmunosensor.

Una vez escogido el derivado fenólico y el tipo de electrodo que proporcionan la mejor respuesta, se optimizaron las demás variables que afectan a la preparación del inmunoconjugado y a la detección. En este caso, las primeras variables que se estudiaron fueron las relacionadas con la medida electroquímica. Estas fueron la técnica voltamperométrica de medida y sus variables características, la concentración del sustrato enzimático (4-aminofenilfosfato, 4-APP) y el periodo de tiempo necesario para la reacción enzimática. En relación a la preparación del inmunoconjugado, se estudió la influencia de la cantidad de mAbhGH-TsMBs, así como las de pAbhGH y de AP-anti-IgG, y sus respectivos tiempos de incubación.

-Elección de la técnica voltamperométrica de medida

Se compararon las respuestas del 4-aminofenol en medio regulador Trizma 0.1 M de pH 9.0 sobre el electrodo SPAuE BT, empleando las técnicas de voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y de onda cuadrada (SWV), con los resultados que se muestran en la Figura 91. Como puede apreciarse, la última técnica es más sensible, proporcionando respuestas de magnitud considerablemente mayor que la técnica diferencial. Así, en el intervalo de potencial barrido, el pico anódico, que aparece aproximadamente a 0 V, y que debe corresponder a la oxidación del grupo fenol, presenta una corriente prácticamente doble en SWV que la obtenida en DPV. Este resultado es el esperado teniendo en cuenta las características de dicha técnica y el comportamiento cuasi-reversible de la especie electroactiva sobre el electrodo. Teniendo esto en cuenta, con el objetivo de alcanzar la mayor intensidad por unidad de concentración, las medidas electroquímicas se realizaron mediante SWV.

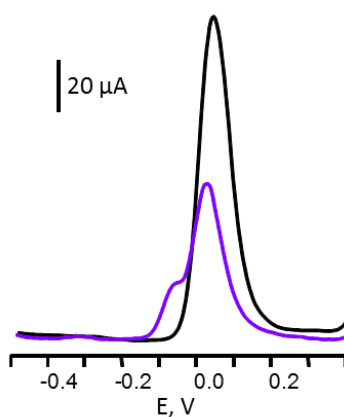


Figura 91.- Voltamperogramas de 4-aminofenol 1.0 mM en regulador Trizma de pH 9.0: (—) DPV, $v=10$ mV/s; $\Delta E = 50$ mV; (—) SWV, $f=15$ Hz; $\Delta E_s=4$ mV; $E_{sw}=25$ mV

-Optimización de las variables características de la SWV

El estudio de los parámetros que afectan a las respuestas mediante SWV es un requisito necesario para poder obtener el mejor rendimiento de esta técnica, que se caracteriza por su elevada sensibilidad y rapidez. Como es sabido, estos parámetros son la frecuencia, f , la altura del salto, ΔE_s , y la amplitud de la onda, E_{sw} .

En la Figura 92 se han representado las tendencias observadas en los estudios de su influencia sobre la respuesta de oxidación de una disolución de 4-aminofenol 1.0 mM, así como los valores escogidos como óptimos con el criterio de alcanzar los mejores niveles de sensibilidad, rapidez y selectividad en la determinación.

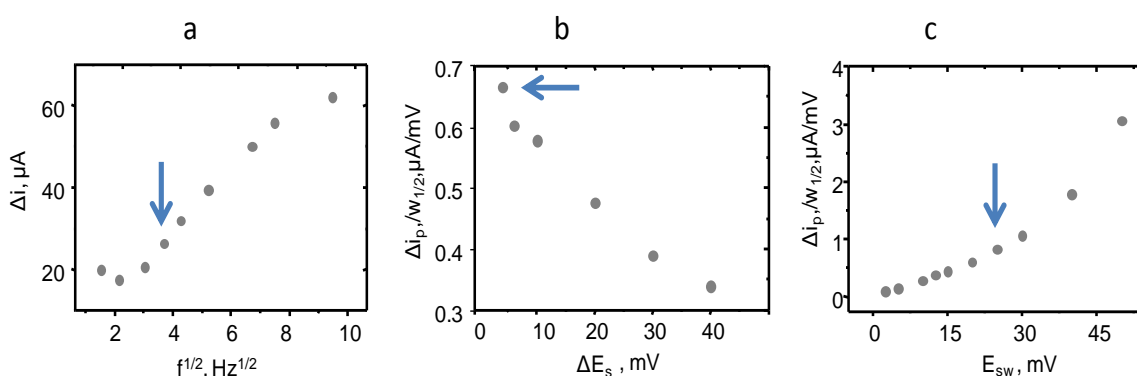
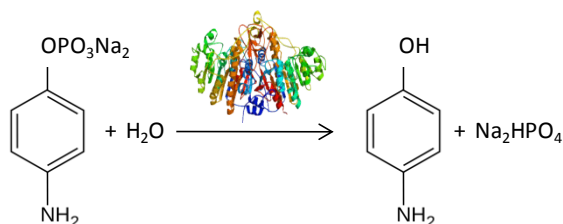


Figura 92.- Optimización de los parámetros característicos de la voltamperometría de onda cuadrada: 4-aminofenol 1.0 mM en regulador Trizma 0.1 M de pH 9.0

Por un lado, la frecuencia elegida, 15 Hz, es la que proporciona la mayor señal para un potencial de pico menos positivo. Por otro, el valor de la altura del salto, 4 mV, es el que da lugar a una mejor definición del pico con la mayor relación corriente neta a anchura de pico. Por último, la amplitud de la onda, 25 mV, es la que permite obtener también la mejor relación $\Delta i_p/W_{1/2}$ unido al potencial de pico menos positivo.

-Influencia de la concentración de 4-aminofenilfosfato (4-APP)

Debido al buen comportamiento electroquímico del 4-aminofenol, se eligió 4-aminofenilfosfato como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina utilizada como marcador del anticuerpo de detección. La hidrólisis de este compuesto se produce de acuerdo con la siguiente reacción:



Para optimizar la concentración de 4-APP, se prepararon inmunosensores completos, AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AP-anti-IgG, pAbhGH en dilución 1/1000, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hGH y 2 μL de mAbhGH-TsMBs, midiendo la respuesta en SWV de disoluciones de 4-APP en el intervalo comprendido entre 0.01 y 1 mM. Como puede apreciarse en la Figura 93, la corriente de pico aumenta rápidamente con la concentración del sustrato enzimático cuando esta varía entre 0.01 y 0.1 mM, para luego estabilizarse prácticamente a las concentraciones más altas. Por eso, con el fin de asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de fosfatasa alcalina, se escogió una concentración 1 mM de 4-APP como óptima para el trabajo posterior.

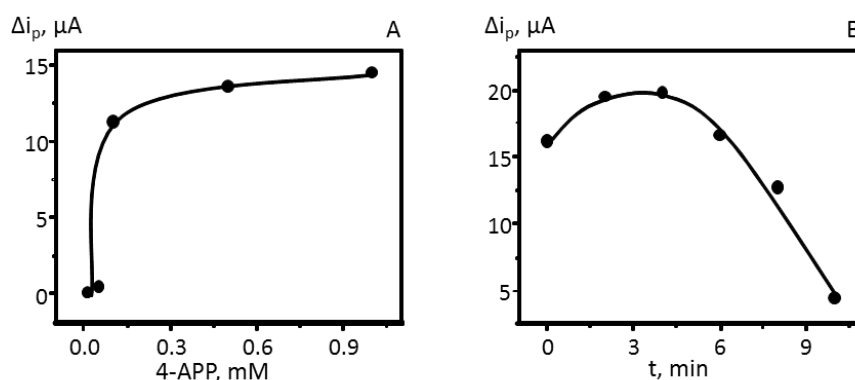


Figura 93.- Influencia de la concentración de 4-APP (A) y del intervalo de tiempo para la reacción enzimática (B) sobre la respuesta del inmunosensor. Más información, en el texto.

-Influencia del intervalo de tiempo para la reacción enzimática de 4-APP

Como se observa en la figura anterior (Figura 93B), el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción enzimática en presencia de fosfatasa alcalina, también se optimizó en las condiciones experimentales indicadas previamente. Los resultados obtenidos mostraron valores máximos de la corriente neta entre 2 y 4 minutos, apreciándose una caída brusca de la intensidad para tiempos superiores. Este descenso se debe probablemente al ensuciamiento del electrodo causado por el 4-aminofenol generado. Por ello, se eligió un tiempo de reacción de 2 minutos.

-Influencia de la cantidad de conjugado mAbhGH-TsMBs

Para la preparación del inmunosensor de hGH se emplearon micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo (p-toluenosulfonilo), debido a su capacidad de formación de uniones covalentes estables con las proteínas (ver esquema de reacción en la Figura 94). El procedimiento seguido para la inmovilización del anticuerpo mAbhGH sobre las micropartículas se obtuvo del protocolo recomendado por el fabricante (Dynal Biotech, Dynabeads® M-280 Tosylactivated), con algunas modificaciones. Aunque el tiempo requerido para la preparación de los inmunoconjugados es largo (18 h a 37°C), una vez que estos son obtenidos, pueden almacenarse en condiciones adecuadas. Después, los inmunosensores pueden construirse a demanda, cuando se necesiten, con el consiguiente ahorro de tiempo.

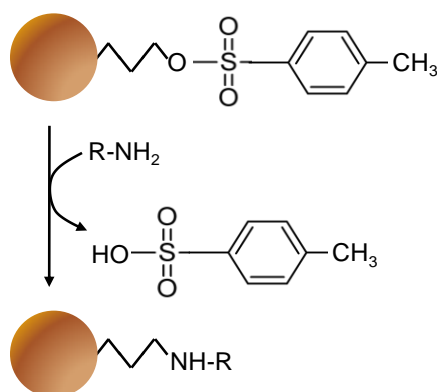


Figura 94.- Esquema de la reacción de formación de uniones covalentes sobre micropartículas funcionalizadas con grupos tosilo y grupos amino

Una vez preparado el inmunoconjugado mAbhGH-TsMBs en las condiciones descritas (Apdo. 4.5.2.2. de la Parte Experimental), con 20 μL de disolución del anticuerpo de 1 mg/mL para 33 μL de suspensión de micropartículas, se optimizó la dilución más adecuada a aplicar sobre la suspensión del mismo para continuar las etapas de construcción del inmunosensor. Para ello, se midieron las respuestas de corriente para conjugados AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs preparados con pAbhGH en dilución 1/1000 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de AP-anti-IgG, así como en presencia de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH, a partir de suspensiones de mAbhGH-TsMBs a distintas diluciones: 1/10, 1/4, 1/3, 1/2 y 1. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 95A. En ella se observa cómo las mayores señales se obtienen para las diluciones 1/3 y 1/2 de la suspensión del conjugado. Un estudio de la reproducibilidad de las medidas con distintos inmunosensores preparados empleando ambas diluciones proporcionó valores de RSD ($n=3$) notablemente más bajos (3.8%) para la dilución 1/3 que para la 1/2 (8.2%), por lo que se eligió aquella para el trabajo posterior.

Una vez optimizada la dilución de la suspensión de mAbhGH-TsMBs, se estudió la influencia del volumen de la misma sobre la respuesta del inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs preparado en las condiciones anteriores, en presencia de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH o en ausencia de antígeno. Para ello, se varió el volumen de suspensión diluida del conjugado en el intervalo comprendido entre 1 y 5 μL , con los resultados que se muestran en la Figura 95B. En este caso se observa que los valores más altos de la corriente neta se obtienen para 1 y 2 μL , apreciándose un rápido descenso de la señal para volúmenes mayores, debido probablemente al aumento de la resistencia a la transferencia electrónica. Por ello, con el fin de alcanzar la mayor sensibilidad, se eligió un volumen de 2 μL como óptimo. En la Figura 95B puede observarse también que las señales inespecíficas obtenidas en ausencia de hGH son de baja magnitud, representando valores en torno a un 10% o menos de la corriente de pico en presencia de analito.

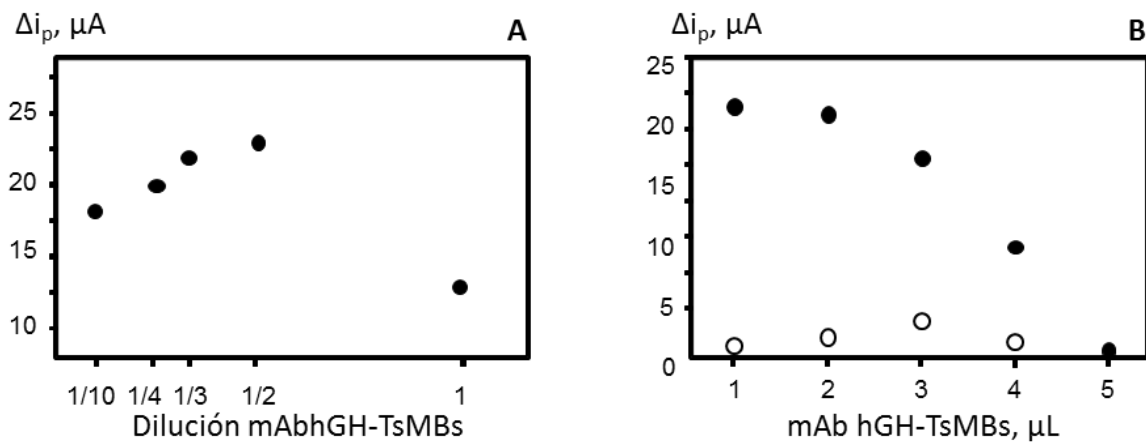


Figura 95.- Influencia de (A) la dilución y (B) el volumen de la suspensión del conjugado mAbhGH-TsMBs sobre la respuesta del inmunosensor. Más información en el texto.

-Influencia de la cantidad de pAbhGH y del tiempo de incubación

Se optimizó la cantidad de anticuerpo necesario para la configuración de tipo sandwich, preparando distintos inmunosensores en las condiciones anteriores, empleando diferentes diluciones de pAbhGH en el intervalo comprendido entre 1/10000 y 1/10, así como tiempos de incubación de 30 minutos. Como puede observarse en la Figura 96A, la corriente neta aumenta con la concentración del anticuerpo hasta una dilución 1/1000. Concentraciones más bajas parecen insuficientes para saturar la hGH, mientras que diluciones menores proporcionan concentraciones excesivas que probablemente bloquean a la hormona impidiendo la incorporación posterior del anticuerpo de detección. Con el fin de alcanzar una buena sensibilidad se escogió una dilución de pAbhGH de 1/1000 para estudios posteriores.

Por otro lado, en relación al tiempo de incubación del anticuerpo sobre el conjugado hGH-mAbhGH-MBs, se estudió el intervalo comprendido entre 15 y 60 minutos con los resultados representados en la Figura 96B. Puede apreciarse un aumento de la corriente neta hasta un tiempo de 30 min. A partir de este valor la respuesta es prácticamente constante, lo que indica que este intervalo es suficiente para que se produzca una unión efectiva con la hormona y, por tanto, fue el escogido para preparar el inmunosensor.

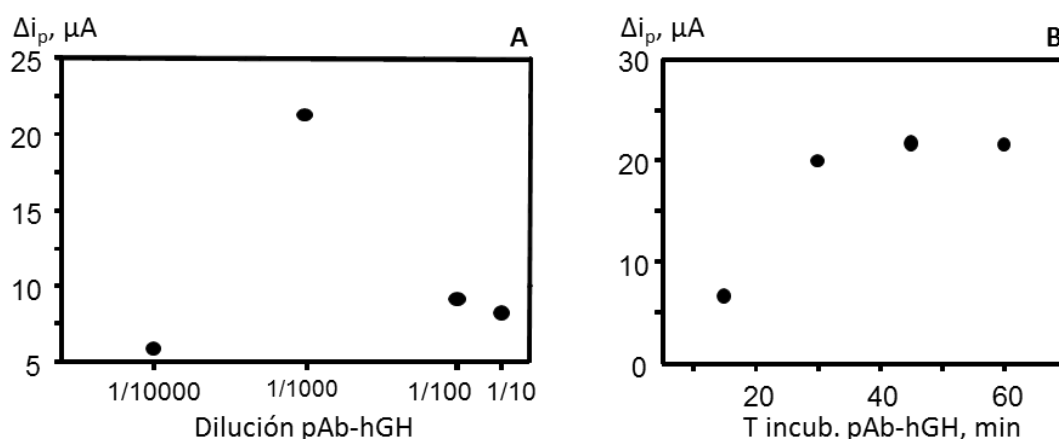


Figura 96.- Influencia de la cantidad (A) y el tiempo de incubación (B) de pAbhGH.

-Influencia de la cantidad de AP-anti-IgG y del tiempo de incubación

Para optimizar la cantidad del anticuerpo de detección necesaria para obtener la máxima sensibilidad, se prepararon diferentes inmunosensores AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE en las condiciones experimentales anteriores, empleando distintas concentraciones del mismo en el intervalo de 0.1 a 4 $\mu g/mL$. En este caso, dada la fuerte dependencia de la corriente con la concentración del anticuerpo marcado, para cada uno de los valores ensayados se midieron varios puntos de calibrado para hGH. Además, a las respuestas en SWV se les restó la señal del inmunosensor preparado en ausencia de hGH (señal inespecífica), obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 97.

Puede verse cómo, a las concentraciones más bajas de AP-anti-IgG (0.1 y 0.5 $\mu g/mL$), la corriente prácticamente no varía con la concentración de la hormona, mientras que empleando 1.0 y 2.0 $\mu g/mL$ de anticuerpo marcado, es posible observar dicha variación, obteniéndose calibrados de pendiente relativamente acusada. Sin embargo, cuando se utilizó una concentración de 4 $\mu g/mL$, la corriente fue mucho menor para todas las concentraciones de hGH.

Este resultado se debe probablemente a que la corriente de fondo originada por la adsorción inespecífica del anticuerpo marcado, que es muy baja para las concentraciones de AP-anti-IgG comprendidas entre 0.1 y 2.0 $\mu g/mL$, se hace significativamente mayor cuando se

utiliza esta última concentración [Díaz-González, 2006]. Por todo ello, se eligió una concentración de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ para estudios posteriores.

Finalmente, se estudió la influencia del tiempo de incubación del anticuerpo AP-anti-IgG en el intervalo de 15 a 90 minutos, utilizando el resto de condiciones previamente optimizadas. En este caso (Figura 97B) puede apreciarse un máximo de corriente para 40 min, que fue el tiempo elegido.

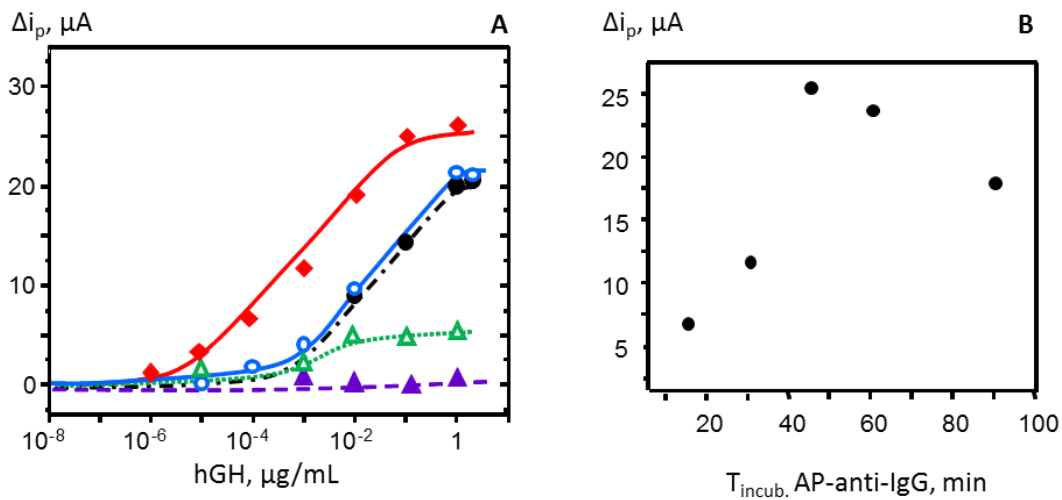


Figura 97.- Influencia de (A) la cantidad de AP-anti-IgG: \blacktriangle 0.1 $\mu\text{g/mL}$; \triangle 0.5 $\mu\text{g/mL}$; \bullet 1 $\mu\text{g/mL}$; \blacklozenge 2 $\mu\text{g/mL}$; \circ 4 $\mu\text{g/mL}$; (B) el tiempo de incubación.

Al igual que en otros capítulos, una vez optimizadas todas las variables implicadas, se han resumido en la Tabla 31 los valores estudiados y los elegidos como óptimos para la preparación de inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE.

Tabla 31.- Condiciones experimentales óptimas de preparación y funcionamiento del inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE.

Variable	Tipo/Intervalo	Elegido
Sustrato de la enzima AP	PP, 1-NP, 4-APP*	4-APP
Electrodo	SPCE, SPAuE AT, SPAuE BT	SPAuE BT
Técnica voltamperométrica	DPV, SWV	SWV
Parámetros característicos de SWV	f, 1-100Hz; ΔE_s , 4-40mV; E_{sw} , 5-50mV	15 Hz, 4 mV, 25 mV
Concentración de 4-APP, mM	0.01 – 1	1
Tiempo reacción enzimática, min	0 - 10	2
Concentración mAbhGH, mg/mL	-	1
Volumen mAbhGH, μ L	-	20
Volumen TsMBs, μ L	-	33
Tiempo unión mAbhGH-TsMBs, h	-	18
Dilución susp. mAbhGH-TsMBs	1/10, 1/4, 1/3, 1/2, 1	1/3
Volumen susp. mAbhGH-TsMBs, μ L	1 - 5	2
Dilución pAbhGH	1/10000 - 1/10	1/1000
Tiempo incubación pAbhGH, min	15 - 60	30
Concentración AP-anti-IgG, μ g/mL	0.1 - 4	2
Tiempo incubación AP-anti-IgG, min	15 - 90	40

CLAVE: *fenilfosfato, 1-naftilfosfato, 4-aminofenilfosfato

5.3.1.2. Calibrado y características analíticas

En las condiciones optimizadas previamente, se obtuvo el calibrado para la determinación de hGH con el inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE que se muestra en la Figura 98. El intervalo lineal ($r=0.998$) abarca desde 0.01 a 100 ng/mL (Tabla 32), con una ecuación $\Delta i(\mu A) = 5.7 \log C(\text{ng/mL}) + 11.6$. Este intervalo alcanza concentraciones más bajas que el obtenido previamente con un inmunosensor basado en la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR), que comienza en 18 ng/mL [Treviño, 2009a]. El límite de detección, 0.005 ng/mL, se calculó con el criterio de tres veces la desviación estándar de las señales ($n=10$) de una disolución de 0.1 ng/mL de hGH tomada como estimador del ruido. El valor obtenido es mucho menor que el publicado basándose en la técnica anterior, 4 ng/mL [Treviño, 2009; Treviño, 2009a].

Por otro lado, cuando estas características se comparan con las de los kits de inmunoensayo tipo ELISA (ver Tabla 11 en la Introducción), se observa que el intervalo lineal del calibrado alcanza concentraciones más altas que las mayores descritas en los correspondientes protocolos, al tiempo que el límite de detección es considerablemente más bajo. El buen comportamiento analítico encontrado para este inmunosensor puede atribuirse a la combinación de dos importantes ventajas: por un lado, la preconcentración del inmunoconjugado sobre las micropartículas magnéticas, y la sensibilidad inherente a la técnica voltamperométrica empleada.

Tabla 32.- Características analíticas del método para la determinación de hGH con el inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE.

Característica	Valor
Intervalo lineal, ng/mL	0.01 – 100 ($r = 0.998$)
Ecuación	$\Delta i(\mu A) = 5.6 \log C(\text{ng/mL}) + 11.6$
Límite de detección, ng/mL	0.005
Límite de determinación, ng/mL	0.017
RSD, % ($n=10$) el mismo día	3.0
RSD, % ($n=10$) diferentes días	7.6

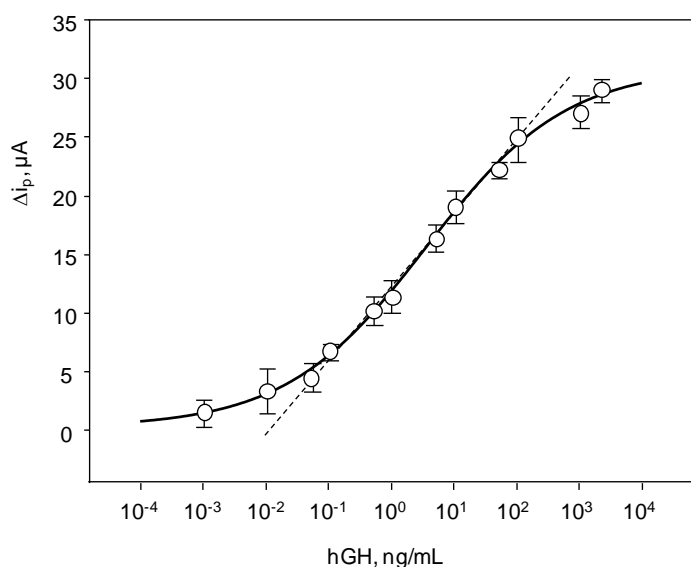


Figura 98.- Calibrado para hGH con el inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAUE

5.3.1.3. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Se evaluó la reproducibilidad de las respuestas voltamperométricas realizando medidas repetidas de disoluciones de 1 ng/mL de hGH durante el mismo día y en días diferentes con distintos inmunosensores preparados para cada ensayo. Los valores de la desviación estándar relativa, RSD (n=10), fueron el 3% y el 7.6%, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto la bondad del procedimiento de preparación de los inmunosensores.

Asimismo, se investigó la estabilidad del inmunoconjugado completo AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs con 1 μg/mL de hGH, preparando dicho conjugado en varios tubos eppendorf que se conservaron a 4 °C durante varios días. De ellos se tomaban las alícuotas correspondientes para construir los inmunosensores sobre el electrodo SPAUE. Como puede observarse en la Figura 99, las respuestas voltamperométricas obtenidas tras la adición de 4-APP 1 mM, permanecieron durante siete días dentro de los límites de control situados a ± 3 veces la desviación estándar de las medidas. La desviación estándar del conjunto de los resultados fue del 7.8% (n=8), lo que demuestra la buena estabilidad de los inmunoconjugados preparados sobre las micropartículas magnéticas. Es importante destacar los inmunoconjugados

estudiados están formados por tres anticuerpos además del antígeno. Aunque en este trabajo no se investigó la estabilidad del conjugado más sencillo, mAbhGH-TsMBs, cuya preparación requiere 18 h, hay que señalar que habitualmente se preparaban varios tubos eppendorf del mismo, que se utilizaban a demanda durante al menos diez días de trabajo experimental sin que se observaran variaciones de corriente apreciables.

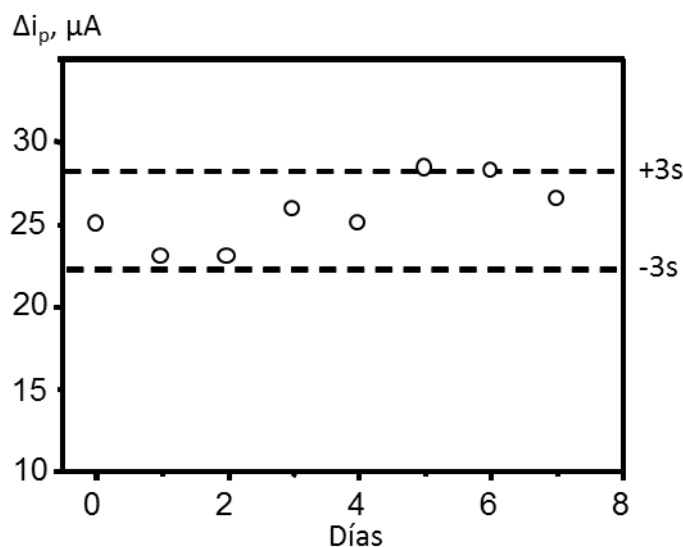


Figura 99.- Diagrama de control construido para evaluar la estabilidad del inmunoconjugado AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs. (Ver el texto para más información).

5.3.1.4. Estudio de interferencias

Con el fin de investigar la selectividad del inmunosensor electroquímico para hGH, se estudió el efecto de diferentes especies que pueden estar presentes junto a esta hormona en las muestras de interés. Las especies ensayadas fueron: testosterona, cortisol, adrenocorticotropina (ACTH) y hormona folículoestimulante (FSH). Se obtuvieron voltamperogramas mediante SWV preparando el inmunosensor en las condiciones experimentales optimizadas previamente, aunque sustituyendo el antígeno hGH por la especie ensayada en una concentración de 1 $\mu g/mL$. Se apreció la ausencia de corriente en todos los casos excepto en el de FSH (Figura 100), lo que se debe probablemente a la presencia de impurezas de hGH (1%) en el preparado comercial de esta hormona. Estos resultados demuestran la elevada selectividad del

magnetoinmunsensor desarrollado para la determinación de hGH en muestras biológicas en presencia de estas especies.

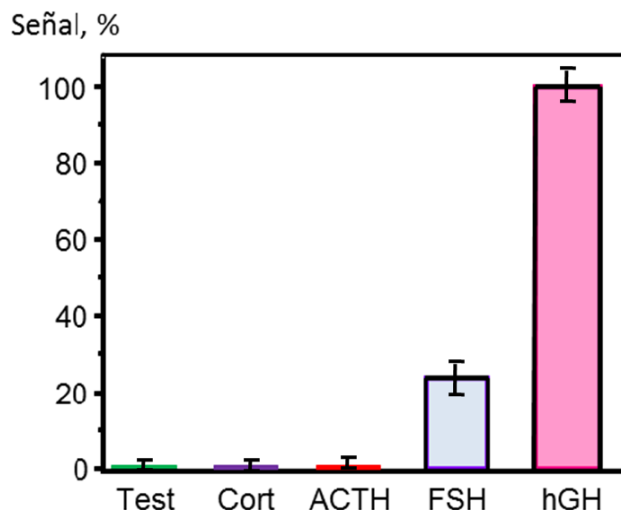


Figura 100.- Corrientes de pico normalizadas medidas con el inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE en presencia de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH o de otras hormonas.

5.3.1.5. Determinación de hGH en suero humano

La utilidad analítica del inmunosensor se demostró por aplicación a la determinación de hGH en suero humano contaminado con la hormona a dos niveles de concentración diferentes: 4 y 0.1 ng/mL. En primer lugar se investigó la existencia de efecto matriz obteniendo calibrados de hGH por dilución del suero reconstituido en presencia de la hormona.

En la Figura 101 se muestra la comparación de las representaciones obtenidas en el intervalo lineal de concentraciones de hGH para un calibrado en el suero y el calibrado externo. El valor medio de la pendiente de los calibrados obtenidos por dilución de la muestra fue $5.7 \pm 0.4 \mu\text{A}$ por década de concentración en ng/mL. Este resultado coincide prácticamente con la pendiente del calibrado de patrones, $5.6 \pm 0.5 \mu\text{A}$ por década de concentración en ng/mL, lo que indica que no existen efectos matriz apreciables en las muestras de suero. Consecuentemente, la determinación de hGH se llevó a cabo por interpolación de las corrientes de pico de las muestras en el calibrado de patrones.

Aplicando esta metodología, se obtuvieron las recuperaciones que se recogen en la Tabla 33 para el análisis de cinco muestras de cada concentración. Como puede verse, los valores medios fueron muy próximos al 100%: 3.9 ± 0.3 ng/mL (96 ± 6 %) y 0.099 ± 0.002 ng/mL (99 ± 2 %), lo que pone de manifiesto la utilidad del inmunosensor para la determinación de hGH en este tipo de muestras sin necesidad de aplicar ningún tratamiento salvo la dilución.

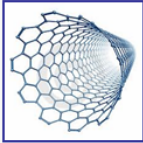
Tabla 33.- Determinación de hGH en suero con el inmunosensor AP-anti-IgG-pAbhGH-hGH-mAbhGH-TsMBs/SPAuE

MUESTRA	Añadido, ng/mL	Encontrado, ng/mL	Recuperación, %
1	4.0	3.8	95
2		3.8	95
3		4.1	102
4		3.6	90
5		4.0	100
Media		3.9 ± 0.3	96 ± 6
1	0.1	0.098	98
2		0.098	98
3		0.101	101
4		0.100	100
5		0.100	100
Media		0.099 ± 0.002	99 ± 2

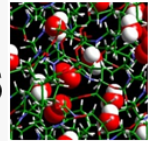
*Valor medio \pm ts/ \sqrt{n} .

5.3.1.6. Conclusiones

El magnetoinmunosensor electroquímico desarrollado en este trabajo para la determinación de hGH combina el empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo, apropiados para la unión covalente de biomoléculas, y el uso de una técnica electroquímica rápida de alta sensibilidad, la voltamperometría de onda cuadrada, lo que proporciona un excelente comportamiento analítico en términos de sensibilidad, selectividad, amplio intervalo de concentración cuantificable, y reproducibilidad. Estas características hacen que este dispositivo y la metodología en la que se basa compita favorablemente con otros inmunosensores descritos previamente empleando la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) de un coste más elevado. Finalmente, añadir la utilidad demostrada como herramienta analítica para la determinación de hGH en muestras clínicas.



5.4. INMUNOSENSORES BASADOS EN MATERIALES HÍBRIDOS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y POLÍMEROS CONDUCTORES ELECTRÓNICOS



La utilidad de los polímeros conductores electrónicos para la preparación de biosensores electroquímicos ha sido sobradamente demostrada. Sin embargo, una de las ventajas de estos materiales, la posibilidad de inmovilización de biomoléculas durante la etapa de electrodeposición, no puede ser aprovechada en el caso de los inmunosensores, ya que, en estas condiciones, la interacción antígeno-anticuerpo queda prácticamente impedida. En este sentido, el empleo de polímeros con grupos funcionales capaces de formar uniones covalentes con las proteínas constituye una alternativa muy eficaz. Uno de éstos, el ácido poli(pirrolpropílico) (pPPA), posee un gran número de grupos carboxilo adecuados para esta finalidad, y puede sintetizarse fácilmente a partir de su monómero, el ácido pirrolpropílico (PPA), formando películas estables y muy porosas sobre distintas superficies electrónicas.

En esta Tesis Doctoral se desarrollaron dos inmunosensores basados en el empleo de pPPA con los siguientes objetivos: en primer lugar, dado que este polímero posee una conductividad relativamente baja respecto a otros como el poli(pirrol) (pPy), se consideró el uso de electrodos de carbono vitrificado modificados con nanotubos de carbono como plataformas de electropolimerización, con el fin de que la reacción electroquímica sobre los electrodos resultantes, pPPA/MWCNTs/GCE, tuviera lugar a través de los poros del polímero sobre la superficie nanoestructurada. Como se verá, esta estrategia proporciona una alta sensibilidad y rapidez de respuesta.

Por otro lado, una vez diseñada la plataforma electrónica, se plantearon dos objetivos particulares. El primero de ellos fue el desarrollo, por primera vez, de un inmunosensor electroquímico para la hormona factor del crecimiento insulínico, IGF-1. Se preparó un esquema de inmunoensayo de tipo sandwich para la determinación de esta hormona, para la que no existía ningún inmunosensor similar. Aprovechando la posibilidad de unión covalente del anticuerpo monoclonal específico anti-IGF1 sobre la superficie electrónica a través del grupo carboxilo, se obtuvo una configuración en la que la adecuada orientación del inmunorreactivo

proporcionó una excelente sensibilidad al tiempo que una buena estabilidad del bioconjugado, haciéndolo apropiado para el análisis de muestras biológicas de interés clínico.

Finalmente, aprovechando la experiencia en el diseño del inmunosensor para PRL como parte de la configuración dual sin marcador (Apdo. 4.2.2.), se consideró la preparación de un nuevo inmunosensor individual para esta hormona, con el reto de satisfacer algunos requisitos esenciales para su uso como dispositivo de diagnóstico inmediato (POC) en orina para la detección de preeclampsia. Como se verá, la unión covalente del antígeno PRL a la superficie del electrodo modificado hizo posible este nuevo diseño, en el que se empleó un esquema de ensayo competitivo indirecto a fin de simplificar su preparación y uso, así como de abaratar costes.

5.4.1. Inmunosensor amperométrico para la determinación de factor de crecimiento insulínico (IGF-1) basado en la inmovilización covalente de anti-IGF1 sobre un electrodo modificado con pPPA/MWCNTs

En la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.4.) se describió el procedimiento de preparación del inmunosensor para la determinación de IGF-1. Brevemente, una vez modificado el electrodo con los nanotubos de carbono, se electrodeposita el polímero y se activan los grupos carboxilo por inmersión del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE en la disolución de EDC/NHSS. A continuación, se realiza un lavado con regulador PBS 0.1 M + KCl 0.1 M de pH 4.5, y se depositan 10 μ L de una disolución de anti-IGF1 en dilución 1/100, dejando incubar durante 90 min a 25 °C en una cámara de ambiente húmedo. Después de un lavado con el mismo regulador, el inmunosensor se mantiene en dicho ambiente a 4 °C hasta su utilización.

Como se ha dicho, para llevar a cabo la determinación de IGF-1, se preparó una configuración de tipo sandwich empleando anti-IGF1 marcado con peroxidasa como anticuerpo de detección. La reacción de afinidad se monitoriza en presencia de catecol como mediador redox, adicionando H₂O₂ y midiendo la respuesta amperométrica de reducción de la 1,2-benzoquinona formada en la reacción enzimática.

5.4.1.1. Optimización de las variables implicadas en la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE

Para la preparación del inmunosensor se utilizaron electrodos de carbono vitrificado modificados con pPPA y MWCNTs; estos últimos fueron nanotubos de carbono de pared múltiple previamente tratados con ácido nítrico 2.6 M a reflujo durante 24 h. Dado que el catecol fue la especie utilizada como mediador redox para las medidas con el inmunosensor, la optimización de las etapas de modificación del electrodo y de electrodeposición del polímero se realizó empleando este compuesto como sonda electroquímica, observando sus respuestas en las diferentes condiciones experimentales ensayadas. Además, las superficies resultantes se caracterizaron por espectroscopía de impedancia electroquímica y voltamperometría cíclica.

Como ejemplo, en la Figura 101 se ha representado un voltamperograma cíclico de catecol 0.5 M sobre el electrodo pPPA/MWCNTs/GCE preparado según el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.4.), que muestra picos anódico y catódico bien definidos. Este voltamperograma se compara más adelante (Figura 106) con los registrados sobre las demás superficies electrónicas obtenidas tras las distintas etapas de modificación.

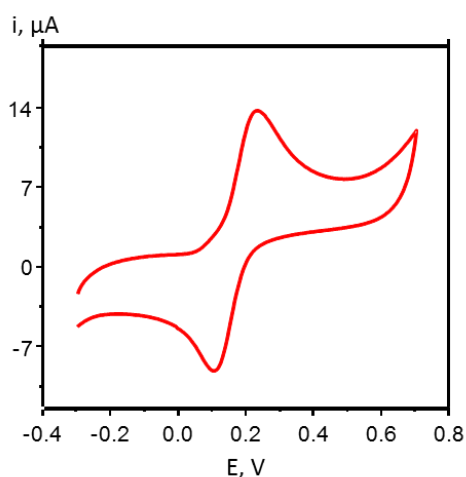


Figura 101.- Voltamperograma cíclico de catecol 0.5 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4, sobre pPPA/MWCNTs/GCE; $v = 50$ mV/s.

-Influencia de la cantidad de nanotubos de carbono

Se estudió la influencia de esta variable preparando electrodos de carbono vitrificado modificados con alícuotas de 2 μL de suspensión en dimetilformamida de 0 a 10 mg/mL de nanotubos carboxilados. A continuación los electrodos MWCNTs/GCE se sumergieron en una disolución de PPA 0.1 M que contenía KCl 0.5 M [Hu, 2011], y se electrodepositó el polímero siguiendo el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.3.). Los resultados obtenidos por medida de la corriente del pico de reducción de catecol por voltamperometría cíclica se han representado en la Figura 102.

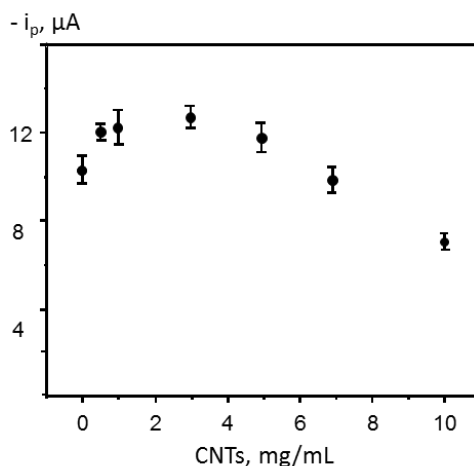


Figura 102.- Efecto de la cantidad de MWCNTs en el electrodo pPPA/MWCNTs/GCE sobre la respuesta de reducción de catecol 0.5 mM en CV; PBS 0.1 mM de pH 7.4; $v=50$ mV/s.

Puede verse cómo la respuesta alcanza su valor máximo para valores comprendidos entre 0.5 y 3.0 mg/mL, produciéndose un descenso notable de la corriente para concentraciones más altas. Este resultado se atribuye al crecimiento homogéneo del polímero sobre la capa de nanotubos depositada en el electrodo, y a la menor conductividad del mismo [Hu, 2011], así como también a cambios en la porosidad del recubrimiento al modificarse la cantidad de nanotubos adsorbidos y consiguientemente, la cantidad de pPPA. Como se verá más adelante, la presencia de MWCNTs en la superficie electródica provoca no solo el incremento de la corriente de oxidación y de reducción del catecol, sino también un aumento de la corriente capacitiva (ver Figura 102). Por ello, con el fin de alcanzar la mejor relación señal/ruido, se

escogió una concentración de 0.5 mg/mL para el trabajo posterior. Este valor proporciona, además, una buena repetibilidad de las medidas, como puede observarse en la barra de error de la Figura 102.

-Influencia de las condiciones de electropolimerización

La preparación de la película de polímero sobre la superficie del MWCNTs/GCE se realizó por electropolimerización mediante voltamperometría cíclica, aplicando barridos sucesivos entre 0 y 0.85 V vs Ag/AgCl sobre el electrodo sumergido en una disolución de PPA 0.1 M y 0.5 M en KCl [Hu, 2011]. En la Figura 103 se han representado algunos ciclos sucesivos de electrodeposición, observándose la disminución de la corriente, más evidente a los potenciales más positivos, a medida que aumenta el número de barridos de potencial. Este comportamiento es debido a la relativamente baja conductividad del polímero, que hace que disminuya la corriente de oxidación conforme aumenta el número de capas depositadas sobre el electrodo MWCNTs/GCE.

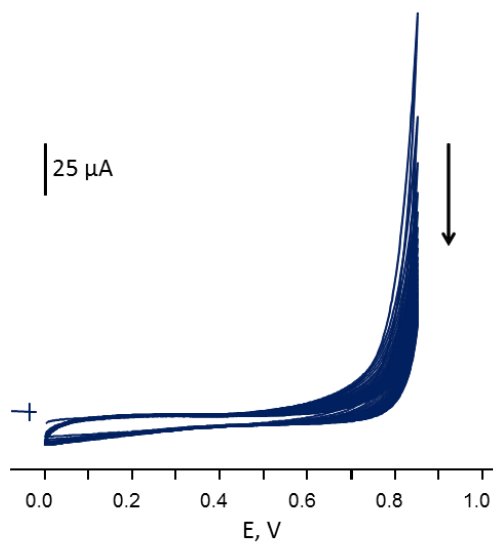


Figura 103.- Ciclos de potencial sucesivos para la electrodeposición del polímero pPPA sobre MWCNTs/GCE. PPA 0.1 M y KCl 0.5 M, $\nu = 100$ mV/s

En esta parte, las variables optimizadas fueron el número de ciclos de potencial aplicados y la concentración de monómero en la disolución de electrodeposición. En la Figura 104A se han representado algunos voltamperogramas cíclicos obtenidos en la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE empleando 10, 30 y 40 barridos sucesivos en las condiciones indicadas. Como puede observarse, tanto la corriente de pico anódica como la catódica disminuyen a medida que aumenta el número de ciclos de potencial aplicados. Este resultado se atribuye a una mayor resistencia a la transferencia de carga a medida que se incrementa el espesor del recubrimiento polimérico [Dong, 2008]. Por ello, como un compromiso entre lograr una alta sensibilidad y disponer de un número elevado de grupos carboxilo disponibles para el enlace covalente del anticuerpo, se eligió un número de 30 ciclos sucesivos como más adecuado para la preparación del electrodo.

De forma similar, se estudió la influencia de la concentración de PPA presente en la disolución de electropolimerización en el intervalo de 0.025 a 0.5 M. Los voltamperogramas representados en la Figura 104B muestran menores corrientes de pico al aumentar la concentración de monómero. Como la cantidad de polímero depositado depende directamente de la concentración de monómero, este resultado es consistente con los anteriores así como con la menor conductividad del electrodo en presencia de una mayor cantidad de polímero. Por tanto, aplicando el criterio anterior, se eligió una concentración 0.1 M de PPA como más apropiada para la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE.

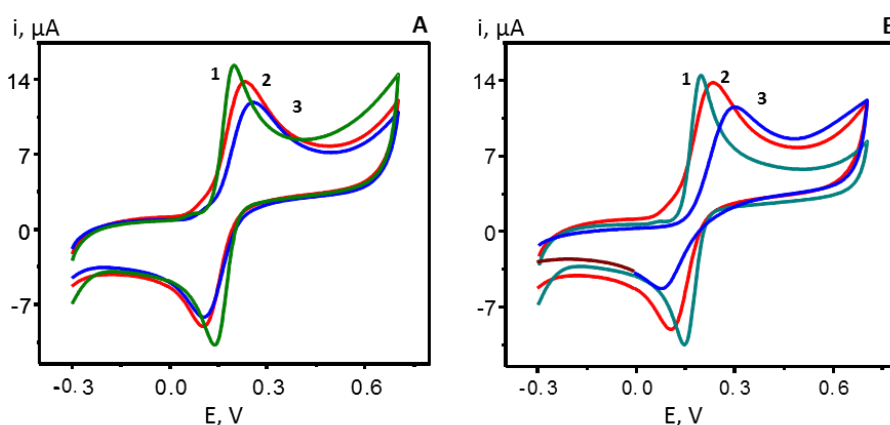


Figura 104.- Voltamperogramas cíclicos de catecol 0.5 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4, sobre electrodos preparados por inmersión de MWCNTs/GCE en: (A) PPA 0.1 M + KCl 0.5 M aplicando 10 (1), 30 (2) y 40 (3) ciclos de potencial a $v=100\text{mV/s}$; (B) PPA 0.025 M (1); 0.1 M (2) y 0.3 M (3) + KCl 0.5 M, aplicando 30 ciclos de potencial a $v=100\text{ mV/s}$.

5.4.1.2. Caracterización de los electrodos pPPA/MWCNTs/GCE

Las diferentes etapas de preparación de los electrodos modificados se caracterizaron por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), registrando las curvas de Nyquist del electrodo de carbono vitrificado sin modificar y modificado con pPPA, MWCNTs o pPPA/MWCNTs, en una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 50 mM y 0.1 M en KCl. Como puede observarse en la Figura 105, el electrodo modificado solo con pPPA (curva A) es el que presenta la mayor resistencia a la transferencia de carga ($R_{ct} > 10^5 \Omega$) debido, como ya se ha comentado, a la menor conductividad de la película polimérica [Dong, 2008]. Sin embargo, dicha resistencia es mucho menor ($R_{ct} = 27,852 \Omega$) sobre el electrodo pPPA/MWCNTs/GCE (curva B), como consecuencia de la presencia de los nanotubos de carbono de elevada conductividad. Aquí debe tenerse en cuenta que, en ambos casos, la repulsión electrostática entre los grupos carboxilo disociados de la superficie electródica y el sistema ferro/ferricianuro aniónico, contribuye al valor de R_{ct} . Finalmente, como era de esperar, el electrodo MWCNTs/GCE fue el que presentó la menor resistencia a la transferencia de carga (curva C-1), con $R_{ct} = 82 \Omega$, valor que es notablemente inferior a la del electrodo sin modificar (curva C-2), $R_{ct} = 3445 \Omega$.

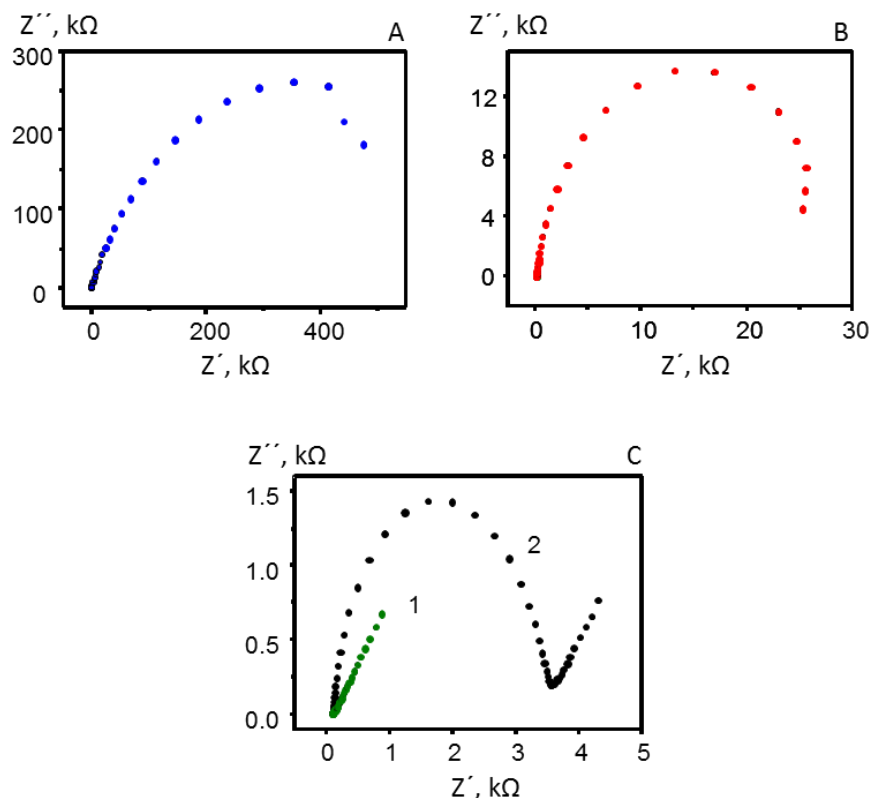


Figura 105.- Curvas de Nyquist obtenidas sobre electrodos de carbono vitrificado modificados con: (A) pPPA; (B) pPPA/MWCNTs; (C-1) MWCNTs/GCE, y (C-2) sin modificar; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 50 mM y 0.1 M en KCl.

Los resultados obtenidos en este estudio se completaron con los que proporciona la medida de los voltamperogramas cíclicos de catecol 0.5 mM sobre los distintos electrodos modificados y el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (Figura 106). Puede verse cómo la curva obtenida sobre el electrodo MWCNTs/GCE (curva 3), es la que presenta las mayores corrientes de pico, con $i_{pa} = i_{pc} = 12.4 \mu\text{A}$, así como una menor separación de picos, con $\Delta E = 0.030 \text{ V}$, valor que corresponde al teórico esperado para una transferencia reversible de dos electrones. Sin embargo, el voltamperograma cíclico obtenido sobre el electrodo modificado con el material híbrido (pPPA/MWCNTs/GCE) (curva 4) muestra corrientes de pico ligeramente menores, con $i_{pa} = 11.3$ e $i_{pc} = 10.5 \mu\text{A}$, y potenciales de pico $E_{pa} = 0.22 \text{ V}$ y $E_{pc} = 0.10 \text{ V}$, con una diferencia $\Delta E = 0.120 \text{ V}$. Por otra parte, los voltamperogramas registrados sobre el electrodo sin modificar (curva 2) y sobre el pPPA/GCE (curva 1) muestran picos más anchos, con mayor separación y menores corrientes de oxidación y de reducción.

Estos resultados ponen de manifiesto la actividad electrocatalítica de los nanotubos de carbono hacia el proceso electroquímico del catecol, así como el buen comportamiento del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE. Como puede apreciarse, a pesar de la gran diferencia encontrada entre los valores de R_{ct} sobre este electrodo y el MWCNTs/GCE, la diferencia en el comportamiento voltamperométrico del catecol sobre ambos electrodos es pequeña. Esto confirma el efecto de la repulsión electrostática antes mencionado, que incrementa notablemente la R_{ct} sobre el electrodo modificado con el material híbrido, y puede justificarse considerando la elevada hidrofiliicidad y porosidad de la película polimérica, que hacen posible el paso de la especie electroactiva a su través, generándose la respuesta electroquímica sobre la superficie de los nanotubos de carbono [Shang, 2009]. En definitiva, estos resultados demuestran que la elección del catecol como mediador redox para la detección de la reacción de inmunofinidad empleando el electrodo pPPA/MWCNTs/GCE, es adecuada.

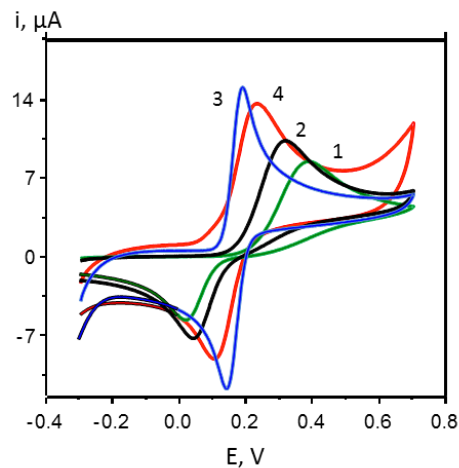


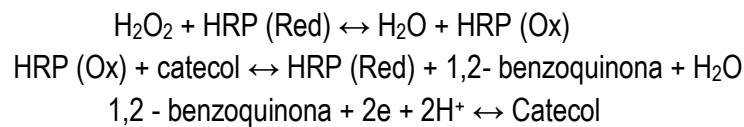
Figura 106.- Voltamperogramas cíclicos de catecol 0.5 mM sobre: (1) GCE; (2) pPPA/GCE; (3) MWCNTs/GCE; (4) pPPA/MWCNTs/GCE; PBS 0.1 M de pH 7.4, $v = 50$ mV/s.

5.4.1.3. Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor para IGF-1

Una vez elegidas las condiciones experimentales óptimas para la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE, se procedió a estudiar la influencia de las variables que afectan a la respuesta amperométrica del inmunosensor. Estas variables fueron: el potencial de detección, la cantidad y el tiempo de incubación del anticuerpo de captura, anti-IGF1, la cantidad y el tiempo de incubación del BSA usado como agente de bloqueo, la cantidad y el tiempo de incubación del anticuerpo de detección, HRP-anti-IGF1, y las concentraciones de H₂O₂ usado como sustrato de la enzima peroxidasa y de catecol empleado como mediador redox. Los resultados obtenidos en estos estudios de optimización se describen a continuación.

-Influencia del potencial de detección

La determinación de IGF-1 se basa, como ya se ha indicado, en la detección de peróxido de hidrógeno en presencia de catecol, haciendo uso de la siguiente secuencia de reacciones:



Con el fin de escoger el potencial más adecuado para detectar la respuesta de reducción de la benzoquinona, se midieron las corrientes en estado estacionario de disoluciones 5 mM de H₂O₂ en presencia de catecol 0.5 mM, en medio PBS 0.1 M de pH 7.4, aplicando distintos potenciales entre -100 y +100 mV vs Ag/AgCl. El inmunosensor se preparó según el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.2.3.), inmovilizando 10 μL de anti-IGF1 en dilución 1:100, y añadiendo 10 μL de IGF-1 de 50 pg/mL y 10 μL de HRP-anti-IGF1 en dilución 1:100.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 107. En ella se ha representado la corriente total, suma de la corriente de fondo más la corriente en estado estacionario (curva 1), y la corriente de fondo (curva 2), observándose que la mayor relación corriente catódica/corriente de fondo en la zona de potenciales donde las señales tienden a estabilizarse, aparece a -50 mV, que fue el valor elegido. Hay que señalar que este potencial proporciona una elevada

selectividad a la detección con el inmunosensor, ya que evita la posibilidad de interferencia por parte de especies como el ácido ascórbico o el ácido úrico, fácilmente oxidables, y que pueden estar presentes en las muestras reales de interés en esta aplicación.

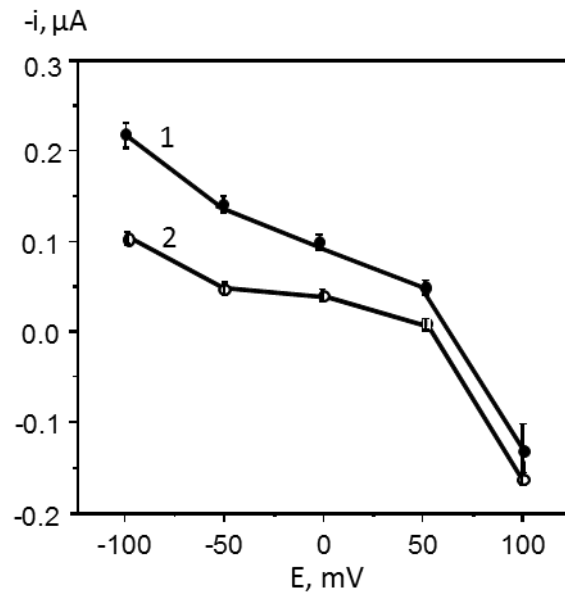


Figura 107.- Efecto del potencial de detección sobre las respuestas amperométricas de H_2O_2 5 mM en presencia de catecol 0.5 mM, en medio PBS 0.1 M de pH 7.4, sobre el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE: (1) corriente total; (2) corriente de fondo.

-Influencia de la cantidad y el tiempo de incubación de anti-IGF1

La inmovilización del anticuerpo anti-IGF1 se realizó por unión covalente a los grupos carboxilo del pPPA en la superficie del electrodo. Con el fin de activar dichos grupos, el electrodo modificado se sumergió primero en una disolución de 2 mg/mL de cada uno de los reactivos clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y sulfato de N-hidroxisuccinimida (NHSS) durante 15 minutos a 25 °C (ver Figura 108) Después, tal como se indica en el Procedimiento 4.5.2.3. de la Parte Experimental, una vez lavado, se depositaron sobre el electrodo 10 μ L de disolución de anticuerpo a distintas diluciones comprendidas entre 0.02/100 (factor de dilución 5000) y 2/100 (factor de dilución 50), dejando incubar durante 90 min a 25 °C en una cámara de ambiente húmedo. Finalmente, cada inmunosensor se completó añadiendo 10 μ L de IGF-1 de 50 pg/mL y 10 μ L de HRP-anti-IGF en dilución 1:100.

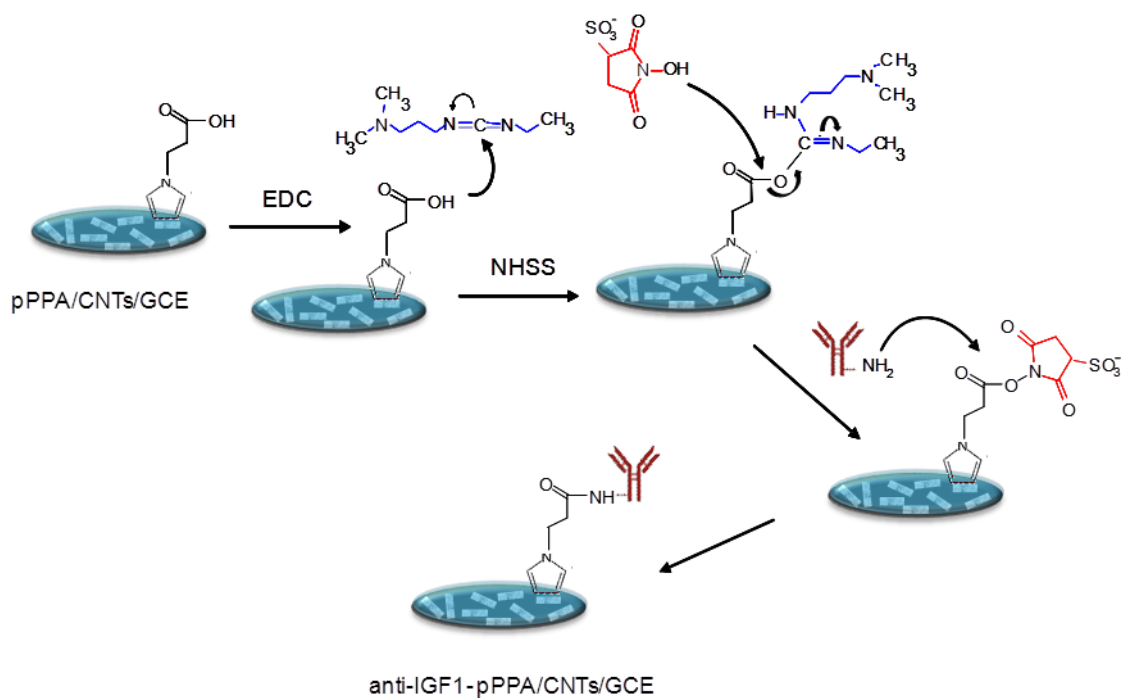


Figura 108.- Esquema de la activación de los grupos carboxilo del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE con el sistema EDC/NHSS y la inmovilización del anticuerpo anti-IGF1.

En la Figura 109A se han representado los resultados de la medida amperométrica a -50 mV de disoluciones de H_2O_2 5 mM en presencia de catecol 0.5 mM. Como puede observarse, la corriente aumenta a medida que lo hace la cantidad de anticuerpo en la superficie del electrodo debido a que se mutiplican los puntos de unión del antígeno a la superficie del mismo. Sin embargo, una concentración excesiva de anti-IGF1 da lugar a la rápida disminución de la señal como consecuencia del impedimento a la transferencia electrónica causado por una cantidad elevada de biomolécula aislante. Por otro lado, en relación al tiempo de incubación (Figura 109B), se observa que el tiempo óptimo es de 90 min, que fue el elegido para el trabajo posterior.

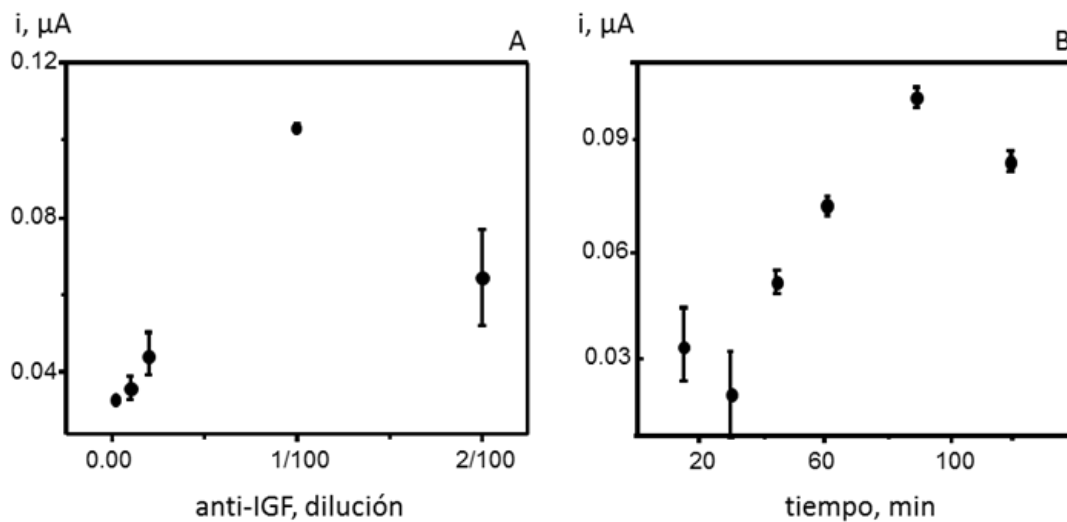


Figura 109.- Efecto de la cantidad de anti-IGF1 incubado durante 90 min (A) y del tiempo de incubación de anti-IGF1 para una dilución 1:100 (B) sobre la respuesta amperométrica del inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE. Ver el texto para más información.

-Influencia de la cantidad y el tiempo de incubación de BSA

Se utilizó BSA como agente de bloqueo para minimizar posibles adsorciones inespecíficas. Para optimizar la concentración a utilizar, se estudió la influencia de esta variable sobre la respuesta amperométrica del inmunosensor en el intervalo comprendido entre el 0.1 y el 5%. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 110A, en la que se aprecia cómo la corriente máxima se alcanzó empleando una concentración del 1% de BSA. Por tanto, esta concentración se eligió como más adecuada para bloquear las posiciones vacantes remanentes en la superficie del electrodo. Por otro lado, como muestra la Figura 110B, la corriente alcanza su valor máximo cuando el BSA se incuba sobre el inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE durante 60 minutos, que fue el periodo elegido para el trabajo posterior.

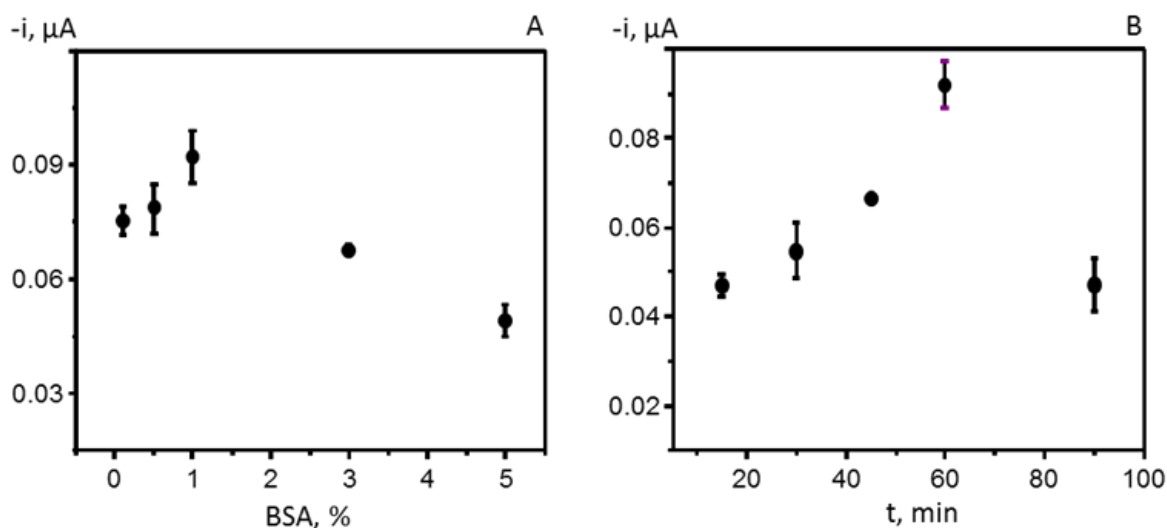


Figura 110.- Efecto de la concentración (A) y del tiempo de incubación (B) de BSA en la respuesta amperométrica sobre el inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE de H_2O_2 5 mM en presencia de catecol 0.5 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4

-Influencia de la cantidad y el tiempo de incubación de HRP-anti-IGF1

Para la preparación de la configuración de tipo sándwich usada para la determinación de IGF-1 se empleó un anticuerpo de detección marcado con la enzima peroxidasa, HRP-anti-IGF1. La optimización de la concentración y el tiempo de incubación de esta especie se realizó, de forma similar a la de apartados anteriores, evaluando la respuesta amperométrica de diferentes inmunosensores preparados con concentraciones de anticuerpo marcado correspondientes a una dilución de 0.02/100 (factor de dilución 5000) a 2/100 (factor de dilución 50).

Como puede apreciarse en la Figura 111a, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la corriente de reducción del catecol tiende a alcanzar un valor constante a partir de una dilución 1/100. Esta debe corresponder a la concentración de saturación del conjugado, y fue la escogida para la preparación del inmunosensor. Por otro lado, la Figura 111 muestra el efecto del tiempo de incubación de dicho anticuerpo marcado. En ella, las respuestas amperométricas obtenidas sobre el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF-pPPA/MWCNTs/GCE con 50 pg/mL de IGF-1 (puntos negros) se comparan con las correspondientes en ausencia de antígeno (puntos blancos) y que son, por lo tanto, las debidas a interacciones no específicas.

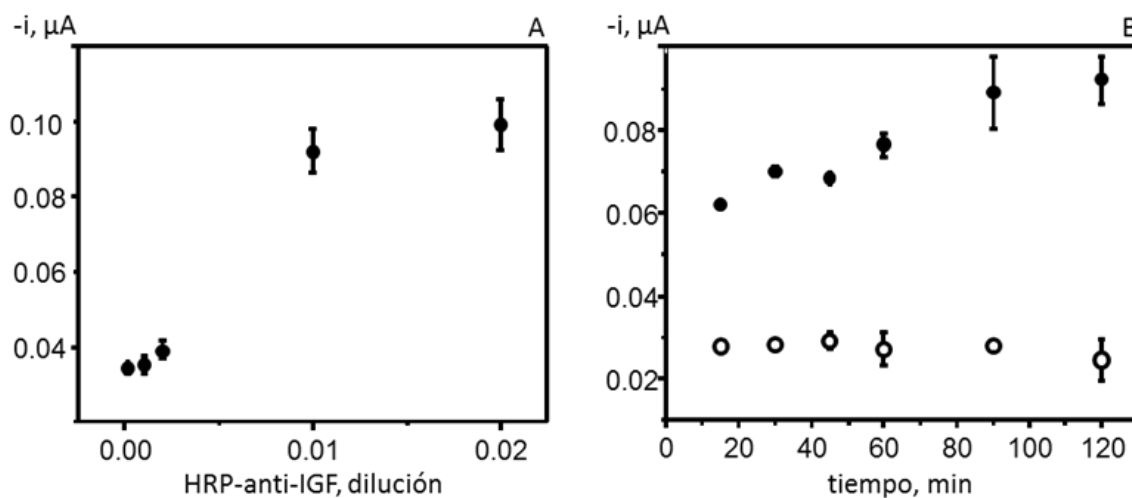


Figura 111.- Efecto de la cantidad de HRP-anti-IGF1 incubado durante 120 min (A) y del tiempo de incubación de HRP-anti-IGF1 para una dilución 1:100 (B) sobre la respuesta amperométrica del inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE: (●) 50 pg/mL IGF-1; (○) 0 pg/mL IGF-1.

Como puede observarse, estas interacciones proporcionan corrientes de baja magnitud en las condiciones experimentales de trabajo, siendo además prácticamente independientes del tiempo de incubación del anticuerpo marcado. Sin embargo, en presencia de IGF-1, se apreció un aumento de la corriente en todo el intervalo estudiado al aumentar dicho periodo. De acuerdo con ello, se eligió un tiempo de incubación de 120 min con el fin de obtener la mayor diferencia entre la respuesta analítica y las corrientes de fondo.

-Influencia de las concentraciones de H₂O₂ y de catecol

Se estudió la influencia de la concentración de H₂O₂ en el intervalo comprendido entre 0.05 y 30 mM con los resultados representados en la Figura 112. Puede verse que la corriente aumenta rápidamente con dicha concentración hasta un valor 5 mM, aproximadamente, manteniéndose a continuación prácticamente constante. Con el fin de asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de HRP, y teniendo en cuenta que una concentración excesiva de H₂O₂ puede dar lugar a una desnaturalización de la enzima [Xiao, 1999], el valor escogido fue 5 mM.

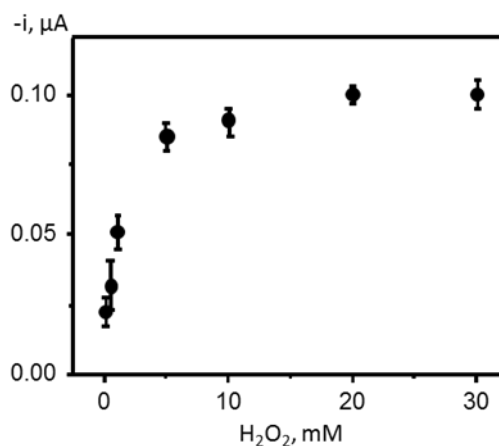


Figura 112.- Efecto de la concentración de H₂O₂ sobre la respuesta amperométrica del inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE.

Por otro lado, en la Figura 113 se han representado los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración del mediador redox en el intervalo comprendido entre 0.005 y 1 mM. Como puede observarse, la corriente aumenta con la concentración de catecol hasta un valor 0.5 mM, disminuyendo a continuación, probablemente como consecuencia de un excesivo ensuciamiento del electrodo. Este comportamiento llevó a elegir la concentración citada como óptima para la determinación de IGF-1 con el inmunosensor.

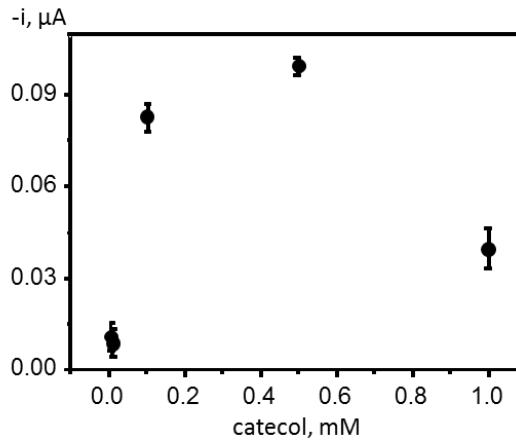


Figura 113.- Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la respuesta amperométrica del inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE.

Como resumen de los estudios de optimización realizados, en la Tabla 34 se muestran las variables y los intervalos evaluados, así como los valores elegidos en cada caso.

Tabla 34.- Variables optimizadas para la preparación y funcionamiento del inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE.

Variable	Intervalo estudiado	Valor elegido
Potencial de detección, mV vs Ag/AgCl	-100 - +100	-50
Cantidad de anti-IGF1, dilución	0.02/100 – 2/100	1/100
Tiempo de incubación de anti-IGF1, min	15-120	90
Cantidad de BSA, %	0.1 - 5	1
Tiempo de incubación de BSA, min	15 - 90	60
Cantidad de HRP-anti-IGF1, dilución	0.02/100 – 2/100	1/100
Tiempo de incubación de HRP-anti-IGF1, min	15 - 120	120
Concentración de H_2O_2 , mM	0.05 - 30	5
Concentración de catecol, mM	0.005-1	0.5

5.4.1.4. Calibrados y características analíticas

En las condiciones experimentales óptimas se obtuvo el calibrado para la determinación de IGF-1 con el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE que se muestra en la Figura 114. Junto a él se han representado algunos de los amperogramas registrados para su elaboración. Además, las características analíticas del método se han resumido en la Tabla 35.

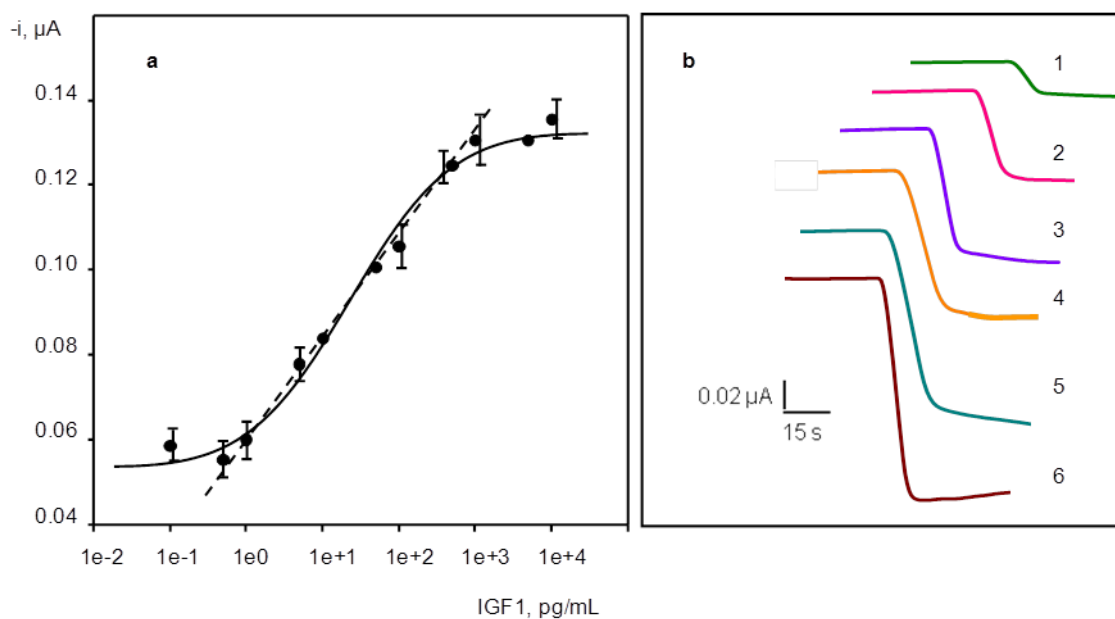


Figura 114.- (a) Calibrado para IGF-1 y (b) respuestas amperométricas para 0 (1), 0.5 (2), 5 (3), 50 (4), 500 (5) y 1000 (6) pg/mL de IGF-1 sobre el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPPA/MWCNTs/GCE

El intervalo lineal de concentración abarca entre 0.5 y 1000 pg/mL de IGF-1, que es apropiado para la determinación de la hormona en muestras reales de interés clínico. Además, este intervalo es mucho más amplio que el reportado para el inmunosensor impedimétrico descrito anteriormente [Rezaei, 2011] (Ver Apdo. 4.2.3.6.). El límite de detección se calculó a partir de la medida repetida ($n=10$) de la corriente de disoluciones de IGF-1 de 0.5 pg/mL , la menor del calibrado, elegida como estimador del blanco. El resultado obtenido con el criterio de tres veces la desviación estándar de dichas respuestas $3s$, con s en unidades de concentración, proporcionó un valor de 0.25 pg/mL . Este resultado es más de cien veces inferior al valor más bajo reportado para los inmunoensayos realizados con los kits ELISA comerciales, 30 pg/mL aproximadamente (ver Tabla 13 de la parte de Antecedentes), y es similar al encontrado con el

inmunosensor impedimétrico (0.15 pg/mL) [Rezaei, 2011], aunque en este caso no se conocen detalles sobre el criterio empleado para su determinación. El límite de determinación, 0.8 pg/mL se calculó aplicando el criterio 10s. Es importante señalar que la elevada sensibilidad alcanzada se debe, probablemente, a la combinación de la alta concentración de anticuerpo de captura, anti-IGF1, que es posible inmovilizar sobre el electrodo modificado con pPPA, y la sensibilidad inherente a la detección amperométrica empleando electrodos modificados con nanotubos de carbono.

Tabla 35.- Características analíticas del método para la determinación de IGF-1 con el inmunosensor HRP-anti-IGF1-IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE

Característica	Valor
Intervalo lineal, pg/mL	0.5 – 1000 ($r^2 = 0.996$)
Ecuación	$i, \mu A = (23.8 \pm 0.5) \times 10^{-3} \log C (\mu g/mL) + (0.203 \pm 0.003) \mu A$
Límite de detección, pg/mL	0.25
Límite de determinación, pg/mL	0.8
RSD, % (n=5) el mismo día	3.7
RSD, % (n=5) diferentes días	3.6

5.4.1.5. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad de la detección amperométrica se evaluó realizando medidas repetidas de disoluciones de IGF-1 de 50 pg/mL en el mismo y en diferentes días empleando distintos inmunosensores. Los valores de la desviación estándar relativa, 3.7% (n=5) y 3.6% (n=5), respectivamente, ponen de manifiesto la elevada reproducibilidad de la detección y del procedimiento de preparación de los inmunosensores.

Para estudiar la estabilidad del inmunosensor, se prepararon diferentes conjugados anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE en el mismo día, que se almacenaron en una cámara de ambiente húmedo a 4 °C y se usaron para medir la respuesta amperométrica de disoluciones de 50 pg/mL de IGF-1 en diferentes días, siguiendo el procedimiento descrito en la Parte Experimental. Los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 115. En ella se muestra un diagrama de control en el que se han señalado los límites correspondiente a \pm tres veces la desviación estándar de las medidas (n=10) realizadas el primer día de trabajo.

Como puede apreciarse, las respuestas obtenidas con el inmunosensor permanecen dentro de dichos límites durante al menos 18 días, que fue el tiempo máximo de experimentación investigado. Este resultado demuestra la elevada estabilidad de los inmunoconjugados, lo que se considera importante ya que pone de manifiesto que es posible su almacenamiento en las condiciones indicadas durante un periodo de tiempo relativamente largo para, posteriormente, ser empleados en el momento preciso.

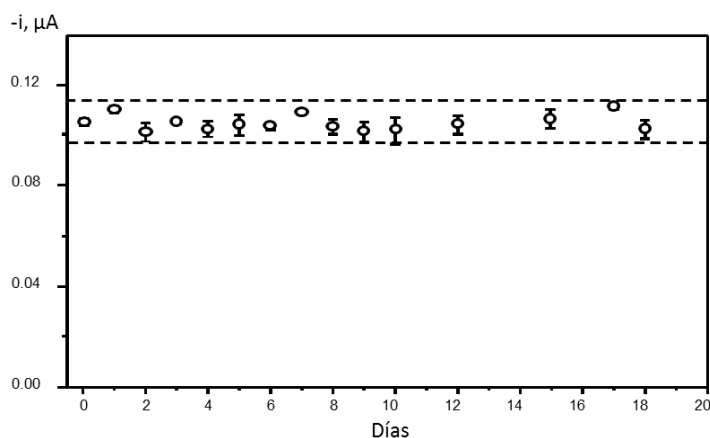


Figura 115.- Diagrama de control construido para evaluar la estabilidad del inmunoconjugado anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE. (Ver el texto para más información).

5.4.1.6. Estudio de interferencias

Con el fin de investigar la selectividad del inmunosensor electroquímico para IGF-1, se estudió el efecto de diferentes especies que pueden estar presentes junto a ésta en las muestras de interés. Teniendo en cuenta que al potencial de detección empleado, -50 mV vs Ag/AgCl, cabe prever que no exista interferencia por parte de compuestos oxidables (ácidos ascórbico y úrico principalmente), se consideraron otras hormonas y proteínas en general: hormona del crecimiento (hGH), prolactina (PRL), testosterona (Test), leptina (Lep), hormona folículo estimulante (FSH) y grelina (Ghr), obteniéndose los amperogramas en disolución agitada del inmunosensor en disoluciones de H₂O₂ 5 mM en presencia de catecol 0.5 mM y 50 pg/mL de cada compuesto. Las respuestas obtenidas se compararon con la correspondiente a 50 pg/mL de IGF-1 y a la debida a interacciones inespecíficas, en ausencia de analito.

Como se muestra en la Figura 116, en todos los casos, la corriente en estado estacionario quedó dentro de los límites de control situados a $\pm 3s$ de la respuesta no específica del inmunosensor, siendo por tanto equivalente a la obtenida en ausencia de IGF-1. Este resultado permite deducir que no existe interferencia apreciable por parte de ninguna de las especies ensayadas, lo que se debe probablemente a la elevada selectividad del anticuerpo utilizado para la preparación del inmunosensor.

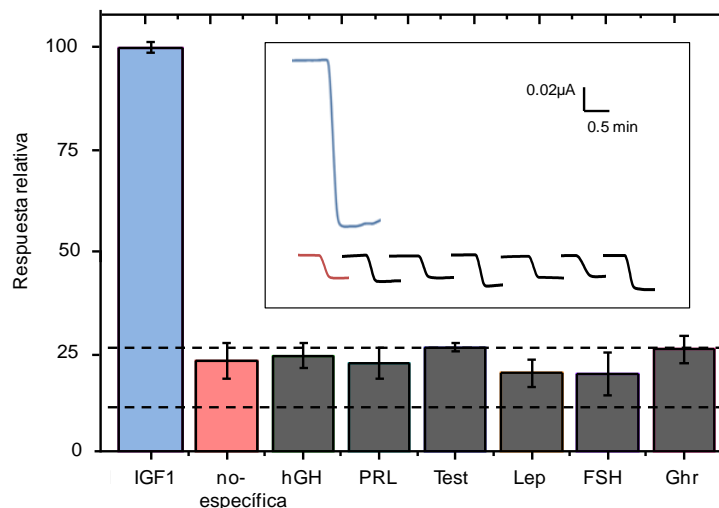


Figura 116.- Respuestas amperométricas medidas con el inmunosensor anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE: (azul) en presencia de 50 pg/mL de IGF-1, (rosa) en ausencia de IGF-1, y (gris) en presencia de 50 pg/mL de hormona del crecimiento (hGH), prolactina (PRL), testosterona (Test), leptina (Lep), hormona folículo estimulante (FSH) y grelina (Ghr).

5.4.1.7. Determinación de IGF-1 en suero humano

Para demostrar la utilidad analítica del inmunosensor, se realizó una aplicación a la determinación de IGF-1 en suero humano contaminado con la hormona a concentraciones comprendidas entre 0.01 y 10 ng/mL. En primer lugar, se obtuvieron calibrados de IGF-1 por dilución de las muestras de suero empleando dos estrategias diferentes para realizar la determinación: en un caso las disoluciones se analizaron sin aplicar ningún otro tipo de tratamiento; en otro, la hormona se aisló primero de las proteínas enlazantes presentes en el suero por tratamiento con disolución de etanol ácido (HCl diluido + etanol) (ver Procedimiento 4.6.6. de la Parte Experimental). Los valores de las pendientes de dichos calibrados fueron, respectivamente $(22.4 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ y $(24.8 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ μA por década de concentración en $\mu\text{g/mL}$. Estos se compararon estadísticamente con la pendiente del calibrado de patrones, $(23.8 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ μA por década de concentración en $\mu\text{g/mL}$, aplicando el test t de Student, encontrando los valores de 1.13 y 1.87 (n=6) que son menores que el valor teórico $t_{\text{tab}}=2.447$ para un nivel de confianza de 0.05. Los resultados obtenidos demuestran que no existen diferencias significativas entre las pendientes, lo que indica que no hay efectos matriz relevantes en las muestras de suero. Consecuentemente, la determinación de IGF-1 se llevó a cabo por interpolación de las señales amperométricas de las muestras en el calibrado de patrones.

En la Figura 117, sobre el tramo recto de dicho calibrado (línea y puntos violeta) se han representado los puntos correspondientes a la medida de las muestras a las que no se aplicó tratamiento excepto la dilución (puntos negros) y de las muestras tratadas (puntos rosas), observándose la práctica coincidencia de aquél con los puntos alineados. En estas condiciones, las recuperaciones de IGF-1 en las muestras de suero fueron muy satisfactorias (Tabla 36), tanto aplicando tratamiento como sin él, obteniéndose valores de la desviación estándar relativa comprendidos entre el 1 y el 6% para las muestras no tratadas, y entre el 0.02 y 6% para las muestras tratadas.

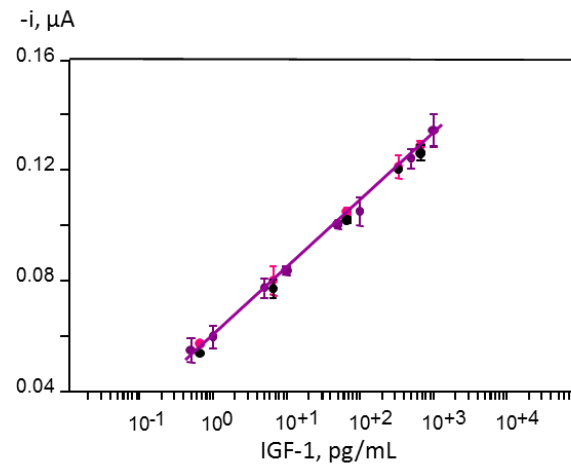


Figura 117.- Respuestas de corriente obtenidas para la determinación de distintas concentraciones de IGF-1 en suero humano: (●) sin tratamiento; (●) tratado con etanol ácido; (●) calibrado de patrones con el inmunosensor HRP-anti-IGF1- IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE para IGF-1.

Tabla 36.- Determinación de IGF1 en suero enriquecido con el inmunosensor HRP-anti-IGF1- IGF1-anti-IGF1-pPPA/MWCNTs/GCE

Muestra	IGF1, ng/mL	IGF1 encontrado, ng/mL (muestras no tratadas)	Recuperación media*, %	IGF1 encontrado, ng/mL (muestras tratadas)	Recuperación media*, %
1	0.01	10.0 x 10 ⁻³ ; 10.3 x 10 ⁻³ ; 10.2 x 10 ⁻³	102 ± 1	10.6 x 10 ⁻² ; 9.60 x 10 ⁻⁴ ; 9.44 x 10 ⁻⁴	99 ± 1
2	0.10	0.101; 0.109; 0.105	105 ± 3	0.092; 0.102; 0.097	98 ± 4
3	1.0	1.01; 1.07; 1.05	104 ± 3	0.991; 0.906; 0.965	96 ± 3
4	5.0	4.83; 5.25; 5.04	101 ± 3	5.20; 5.13; 5.08	102 ± 1
5	10.0	9.93; 9.40; 9.70	97 ± 2	10.2; 9.93; 10.1	101 ± 1

*valor medio ± ts/√n

5.4.1.8. Conclusiones

Se desarrolló por primera vez un inmunosensor para la determinación de la hormona IGF-1 empleando un diseño innovador basado en el empleo del material híbrido pPPA/MWCNTs. La superficie electródica obtenida posee una elevada cantidad de grupos carboxilos capaces de inmovilizar de forma estable el anticuerpo de captura anti-IGF1, mientras que la reacción electroquímica tiene lugar a través de los poros del polímero, sobre los nanotubos de carbono, alcanzándose una alta sensibilidad y rapidez de respuesta. Por último, el inmunosensor demostró su utilidad analítica por aplicación a muestras de suero humano, con buenos resultados.

5.4.2. Inmunosensor voltamperométrico para la determinación de prolactina (PRL) basado en la inmovilización covalente de PRL sobre un electrodo modificado con pPPA/MWCNTs

Para la preparación del inmunosensor de PRL, se utilizó una plataforma electródica equivalente a la anterior, pero se introdujeron aspectos claramente distintos tanto en lo que respecta a la configuración del bioelectrodo como a la forma de detección. Como se ha dicho, se buscó satisfacer requisitos necesarios para su aplicación a la detección de preeclampsia, enfermedad que cursa con un incremento excesivo de prolactina en orina durante la gestación. Con el fin de simplificar la preparación y utilización de este inmunosensor, se inmovilizó covalentemente el antígeno a la superficie del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE (ver esquema en el Apartado 4.5.2.4. de la Parte Experimental), y se desarrolló un esquema de ensayo competitivo indirecto utilizando un anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina, AP-anti-PRL. De este modo, la respuesta electroquímica se obtuvo añadiendo 1-naftilfosfato (1-NPP) como sustrato enzimático, observando la respuesta de oxidación del 1-naftol (1-NP) formado mediante voltamperometría diferencial de impulsos.

5.4.2.1. Optimización de las variables implicadas en la preparación del inmunosensor para PRL

La condiciones experimentales para la preparación del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE fueron las mismas elegidas anteriormente. Por eso, aquí se optimizaron únicamente las variables que afectan al funcionamiento del inmunosensor. Estas fueron: la cantidad de antígeno PRL en la superficie del electrodo modificado, el tiempo y la temperatura para la unión covalente de PRL a dicha superficie, las condiciones de la etapa de bloqueo, la concentración de AP-anti-PRL para el ensayo competitivo, y las condiciones para la formación del complejo AP-anti-PRL-PRL y para la reacción enzimática. Los resultados obtenidos en estos estudios de optimización se describen a continuación.

-Influencia de la cantidad de PRL

Para seleccionar la cantidad de antígeno más adecuada para la preparación del inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE, se midieron las respuestas de varios inmunosensores preparados por deposición de 10 μL de disoluciones de PRL en concentración comprendida entre 10 y 80 $\mu\text{g/mL}$, en ausencia de PRL analito, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, en medio regulador Trizma 0.05 M de pH 9.6 conteniendo 1-NPP 5 mM. Los resultados obtenidos (Figura 118A) mostró un incremento de la corriente de pico al aumentar la cantidad de PRL entre 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Concentraciones más altas dieron lugar a una ligera disminución de la corriente debido probablemente al mayor bloqueo de la superficie electródica. Por tanto, la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ fue seleccionada como óptima con el fin de alcanzar la mayor sensibilidad.

-Influencia del tiempo y la temperatura para la unión covalente de PRL a la superficie del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE

Los resultados obtenidos en estos estudios se han representado en las Figuras 118B y 118C. Como puede observarse, la corriente de pico aumenta rápidamente con el tiempo de reacción, alcanzando un valor máximo a los 120 min, en ausencia de PRL analito. A partir de este tiempo se observaron respuestas mucho menos intensas debidas probablemente al bloqueo de la superficie electródica en presencia de una mayor cantidad de proteína inmovilizada. En cuanto al efecto de la temperatura, la corriente más alta se obtuvo cuando la reacción de formación de la unión covalente de PRL tenía lugar a 25 $^{\circ}\text{C}$. A la temperatura más baja, 4 $^{\circ}\text{C}$, la reacción ocurre de forma muy lenta, mientras que la temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$ puede alterar la estructura polimérica impidiendo el enlace de la proteína. Estos resultados nos llevaron a elegir 120 min y 25 $^{\circ}\text{C}$ como condiciones óptimas para la realización de esta etapa.

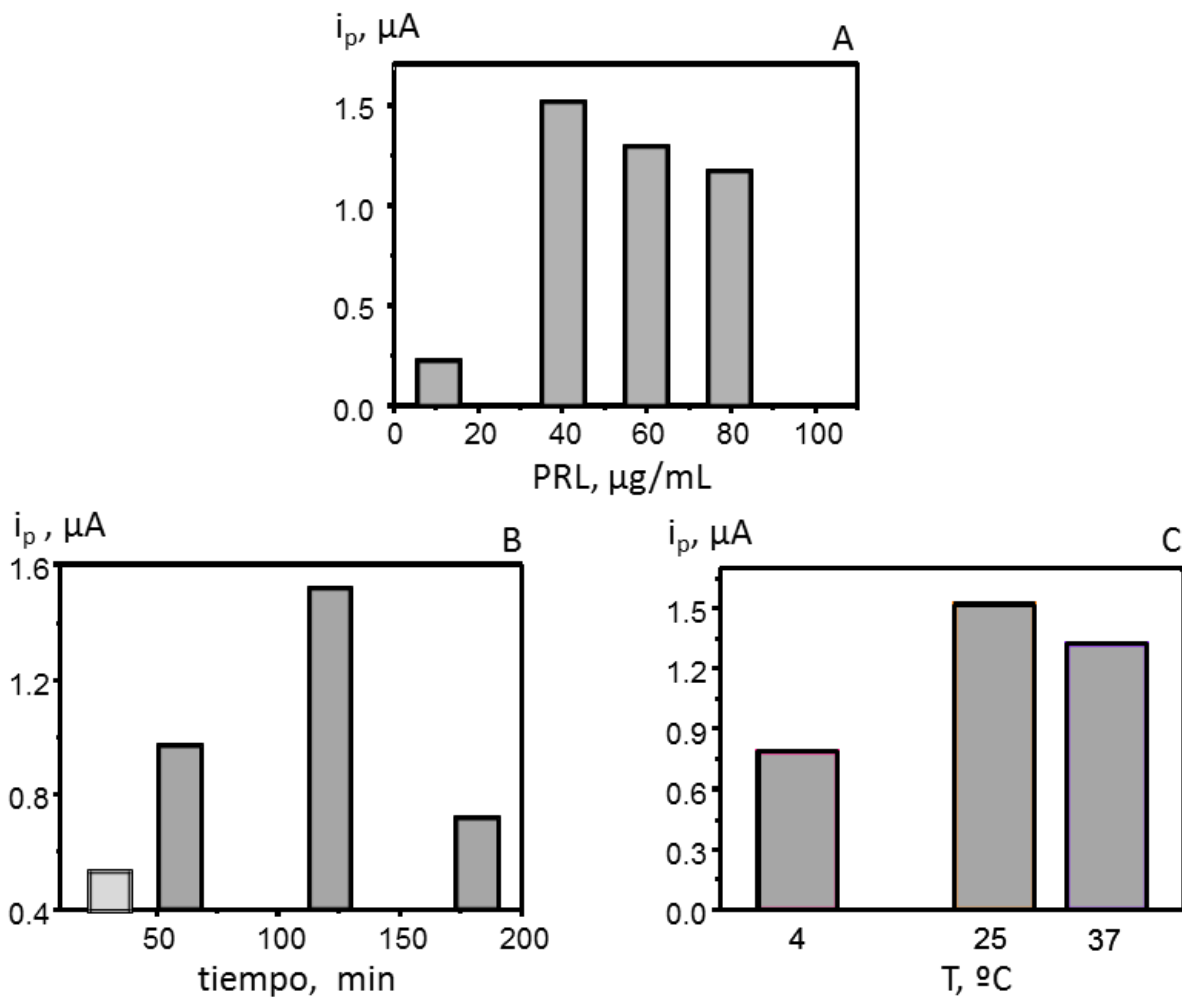


Figura 118.- Efecto sobre la corriente de pico en DPV de la cantidad de PRL (A), del tiempo de reacción (B), y de la temperatura (c) para el enlace covalente de PRL sobre pPPA/MWCNTs/GCE. Condiciones: (A) t incub. PRL, 2 h; 0.01% BSA, t incub. BSA, 1 h; dilución AP-anti-PRL, 1:500, t incub. AP-anti-PRL, 2 h; (B) y (C) como (A) con 40 $\mu\text{g/mL}$ PRL; 1-NPP 5 mM, en regulador Trizma 50 mM de pH 9.6; DPV: $\Delta E = 25$ mV, $v = 20$ mV/s.

-Optimización de la etapa de bloqueo

Para evitar o minimizar las adsorciones inespecíficas en la superficie del electrodo, se incorporó una etapa de bloqueo en el procedimiento experimental para la preparación del inmunosensor, después de la inmovilización de PRL. Se investigaron tres posibles agentes bloqueantes: leche desnatada, caseína y BSA, evaluando la magnitud de las respuestas obtenidas con distintos inmunosensores preparados en ausencia de PRL en disolución (analito), así como las respuestas inespecíficas obtenidas en ausencia de PRL en disolución y en la superficie del electrodo. Como puede observarse en la Figura 119A, las señales inespecíficas obtenidas fueron de muy baja magnitud en los tres casos, lo que puso de manifiesto la efectividad del proceso de bloqueo. Sin embargo, las respuestas específicas fueron muy diferentes, obteniéndose la mayor diferencia entre las señales específica e inespecífica cuando se utilizaba BSA. Esto puede atribuirse al tamaño adecuado de esta proteína, que da lugar a un bloqueo eficaz de la superficie electródica sin impedir la reacción electroquímica de 1-NP. Por el contrario, la caseína, de menor tamaño, probablemente penetra en los huecos de la estructura porosa del híbrido pPPA/MWCNTs, dificultando la transferencia electrónica. Estos resultados llevaron a elegir BSA como agente bloqueante más apropiado para la preparación del inmunosensor.

Una vez elegido este compuesto, se estudió la influencia de la concentración y el tiempo de incubación de BSA sobre el electrodo en las respuestas voltamperométricas obtenidas en las condiciones anteriores. En la Figura 119B se han representado los resultados obtenidos con diferentes inmunosensores preparados con concentraciones de BSA comprendidas entre el 0.005 y el 0.05 %, empleando tiempos de incubación entre 5 y 90 min. Como puede apreciarse, las corrientes inespecíficas fueron muy bajas en todos los casos, mientras que las respuestas específicas más altas se registraron para las concentraciones menores de BSA y los tiempos de incubación más largos. Por tanto, con el fin de alcanzar un efecto de bloqueo efectivo pero no excesivo, así como de aplicar un tiempo razonable de análisis, se eligió una concentración del 0.005 % y un tiempo de 60 min.

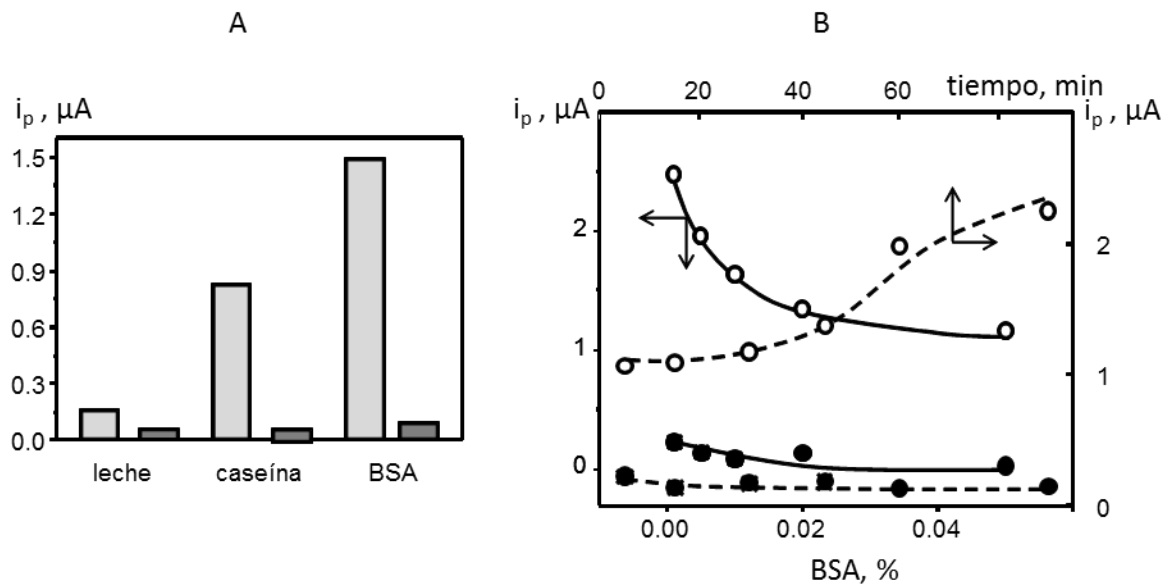


Figura 119.- Efecto (A) del tipo de agente bloqueante en las respuestas específica (gris claro) e inespecífica (gris oscuro) del inmunosensor AP-anti-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE; (B) de la concentración de BSA (—) y el tiempo de incubación (---) en las respuestas específica (○) e inespecífica (●); dilución AP-antiPRL, 1:500; 2 h; agente bloqueante, 0.01% (A), 1h (B —); BSA 0.005% (B - -); PRL inmov., 40 $\mu g/mL$, 2h; 1-NPP 5 mM en regulador Trizma 50 mM de pH 9.6; DPV: $\Delta E = 25$ mV, $v = 20$ mV/s.

-Influencia de la concentración de AP-anti-PRL

La influencia de la concentración de anticuerpo marcado se estudió en el intervalo de diluciones comprendido entre 1:10.000 y 1:50, con los resultados representados en la Figura 120 (línea continua). En ella se aprecia un rápido aumento de la corriente de pico en DPV al disminuir el grado de dilución para las concentraciones más bajas de AP-anti-PRL, alcanzándose una región de estabilidad a partir de un factor de dilución 1:250. Esto sugiere la saturación de la cantidad de PRL inmovilizada en la superficie del electrodo pPPA/MWCNTs/GCE. De acuerdo con la tendencia observada, y con el fin de alcanzar la mayor sensibilidad, se eligió una dilución 1:100 como más adecuada.

Por otro lado, en relación al tiempo de incubación del anticuerpo marcado, se estudió el intervalo comprendido entre 30 y 180 min, encontrándose (Figura 120, línea a trazos) que la respuesta específica alcanzaba un valor máximo para un periodo de 120 min, valor elegido para el trabajo posterior.

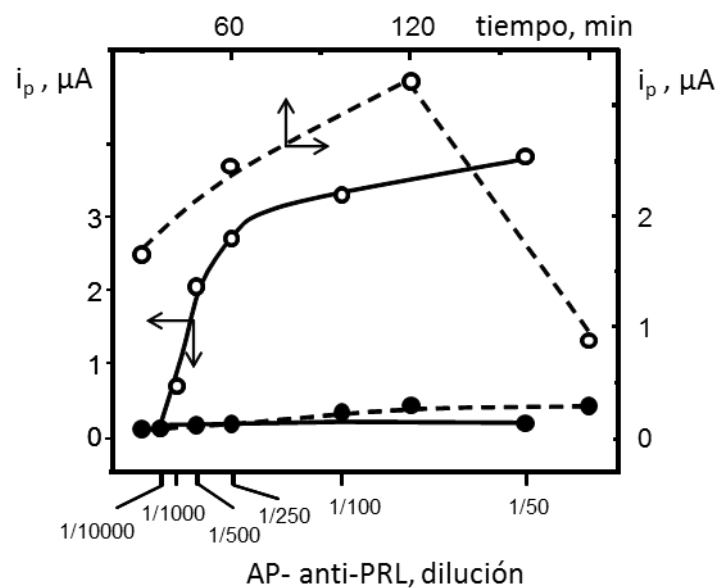


Figura 120.- Efecto de la concentración de AP-anti-PRL, t incub. 2h (—) y del tiempo de incubación, dilución 1:100 (- -) sobre las respuestas específica (○) e inespecífica (●) del inmunosensor: BSA 0.005%, 1h; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRL inmov., 2h; 1-NPP 5 mM en regulador Trizma 50 mM de pH 9.6; DPV: $\Delta E = 25$ mV, $v = 20$ mV/s.

-Optimización de las condiciones para la formación del complejo AP-anti-PRL-PRL

Para seleccionar las condiciones experimentales más apropiadas para la reacción entre el anticuerpo marcado, AP-anti-PRL, y el antígeno PRL en disolución, se investigaron varias mezclas de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PRL y AP-anti-PRL en dilución 1:100, que se mantuvieron en tubos eppendorf a distintas temperaturas y durante diferentes periodos de tiempo, así como aplicando o no agitación continua. Después, alícuotas de 10 μL de las disoluciones resultantes se depositaron sobre el bioelectrodo PRL-pPPA/MWCNTs/GCE, dejando incubar durante 120 min. En la Figura 121 se han representado algunos de los resultados obtenidos, observándose cómo las corrientes de pico no varían apreciablemente cuando la reacción transcurre a 25 o 37 $^{\circ}\text{C}$, así como en disoluciones agitadas o no. Además, se comprobó que 30 min era un tiempo suficiente para que tuviera lugar la reacción de afinidad, encontrándose que la mayor diferencia entre las señales obtenidas en ausencia y en presencia de PRL en disolución se alcanzaba a 25 $^{\circ}\text{C}$. El conjunto de los resultados obtenidos nos llevó a escoger dichas condiciones: 30 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ sin agitación como las más adecuadas para la reacción entre AP-anti-PRL y PRL en disolución.

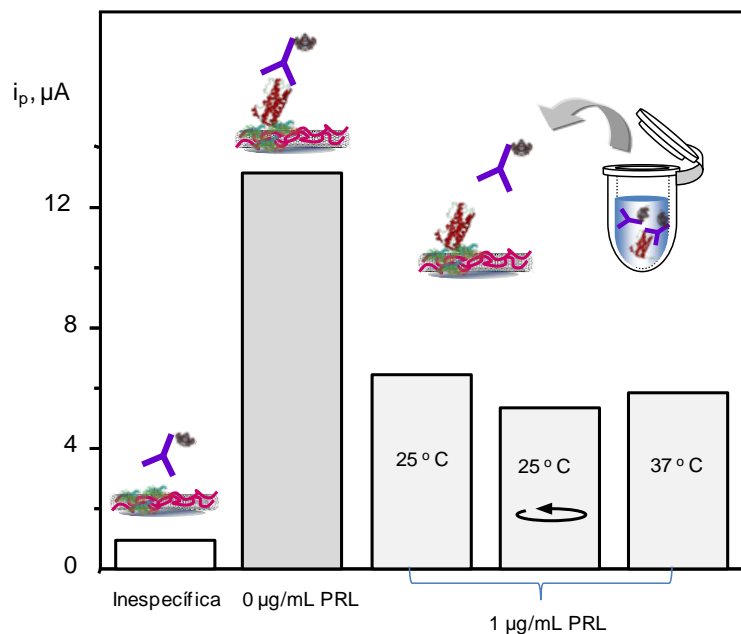


Figura 121.- Efecto de la temperatura y la agitación durante la formación del complejo AP-anti-PRL-PRL en disolución sobre la respuesta en DPV del inmunosensor: BSA 0.005%, 1h; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRL inmov., 2h; 1-NPP 5 mM en regulador Trizma 50 mM de pH 9.6; DPV: $\Delta E = 25$ mV, $v = 20$ mV/s.

-Optimización de las condiciones para la reacción enzimática

En primer lugar se examinaron las respuestas electroquímicas obtenidas en la etapa de detección con tres sustratos de la enzima fosfatasa alcalina. Estos fueron: 4-aminofenilfosfato (4-APP), 1-naftilfosfato (1-NPP) y fenilfosfato (PP). Los voltamperogramas en diferencial de impulsos obtenidos sobre el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE se han representado en la Figura 122A. Como puede verse, todos los compuestos ensayados proporcionan picos bien definidos correspondientes a la oxidación de los derivados fenólicos resultantes de la reacción enzimática. Además, las respuestas se diferencian claramente de las debidas a las interacciones no específicas. Sin embargo, el primer pico del 4-aminofenol, que corresponde a la oxidación del grupo amino, y el pico del 1-naftol, aparecen a potenciales menos positivos que el del fenol, por lo que éste fue descartado. Por otra parte, se observó una menor reproducibilidad de las medidas cuando se usaba 4-APP, lo que llevó a elegir 1-NPP como sustrato de la fosfatasa alcalina.

A continuación se estudió la influencia de la concentración de este compuesto sobre la respuesta voltamperométrica con los resultados que aparecen en la Figura 122B. En el intervalo evaluado, entre 0.1 y 10 mM de 1-NPP, se observó un aumento rápido de la corriente a medida que lo hacía dicha concentración hasta alcanzar un valor 1.0 mM, disminuyendo después ligeramente. Por tanto, se eligió 5.0 mM como más apropiado, con el fin de asegurar que la reacción enzimática dependía únicamente de la concentración de AP. Además, dicha reacción se realizó a pH 9.6, que corresponde a la actividad óptima de la enzima [Ito, 2000].

Por último, la influencia del tiempo para la reacción enzimática se estudió en el intervalo comprendido entre 0 y 10 min (Figura 122B), observándose un aumento continuo de la corriente de pico en todo el margen investigado. Considerando esta tendencia y con el fin de alcanzar la mayor sensibilidad, se fijó un periodo de 10 min para el trabajo posterior.

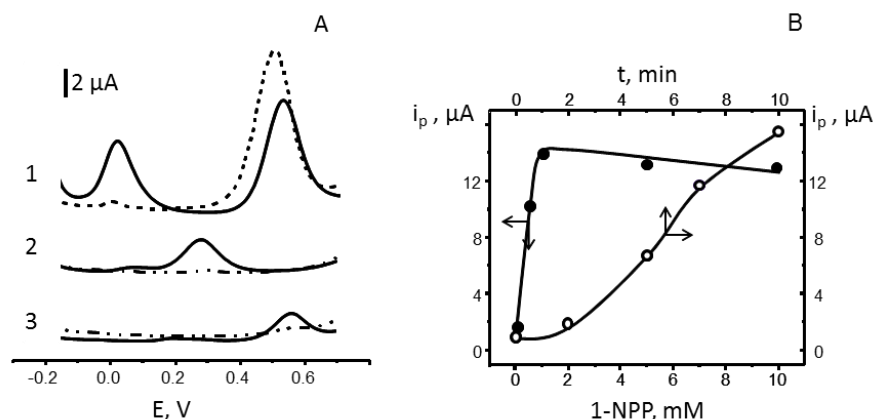


Figura 122.- (A) Voltamperogramas en DP sobre el inmunosensor AP-anti-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE usando (1) 4-aminofenilfosfato (4-APP), (2) 1-naftilfosfato (1-NPP) y (3) fenilfosfato (PP) como sustratos de la AP; (- - -) respuestas inespecíficas. (B) Influencia de la concentración de 1-NPP (●) y el tiempo de reacción (○) sobre la corriente de pico en DPV. Otras condiciones como en la Figura 121.

Al igual que en los capítulos anteriores, en la Tabla 37 se resumen los estudios de optimización realizados, indicando en cada caso las variables correspondientes, los intervalos evaluados y las condiciones óptimas elegidas.

Tabla 37.- Variables optimizadas para la preparación y funcionamiento del inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE.

Variable	Intervalo estudiado	Valor elegido
Cantidad de PRL inmov. sobre pPPA/MWCNTs/GCE, μg/mL	10 – 80	40
Tiempo de reacción para unión covalente de PRL sobre pPPA/MWCNTs/GCE, min	30 - 180	120
Temperatura de reacción para unión covalente de PRL sobre pPPA/MWCNTs/GCE, °C	4, 25, 37	25
Cantidad de BSA, %	0.005 - 0.05	0.005
Tiempo de incubación de BSA, min	5 -90	60
Concentración de AP-anti-PRL, dilución	1:10.000 – 1:50	1:100
Tiempo de incubación de AP-anti-PRL sobre PRL-pPPA/MWCNTs/GCE, min	30 - 180	120
Tiempo para la formación del complejo AP-anti-PRL –PRL en disolución	5 - 60	30
Temperatura para la formación del complejo AP-anti-PRL –PRL en disolución, °C	25, 37	25
Sustrato para la reacción enzimática con AP	4-APP, 1-NPP, PP	1-NPP
Concentración de 1-NPP, mM	0.05 - 10	5.0
Tiempo para la reacción enzimática con AP, min	0 - 10	10

5.4.2.2. Calibrado y características analíticas

En la Figura 123a se ha representado el calibrado obtenido para la determinación de PRL mediante DPV empleando las condiciones experimentales optimizadas previamente. Asimismo, se han representado algunos voltamperogramas obtenidos en dichas condiciones. Como corresponde al tipo de inmunoensayo competitivo empleado en esta configuración, la corriente de pico disminuye conforme aumenta la concentración de antígeno presente en la disolución.

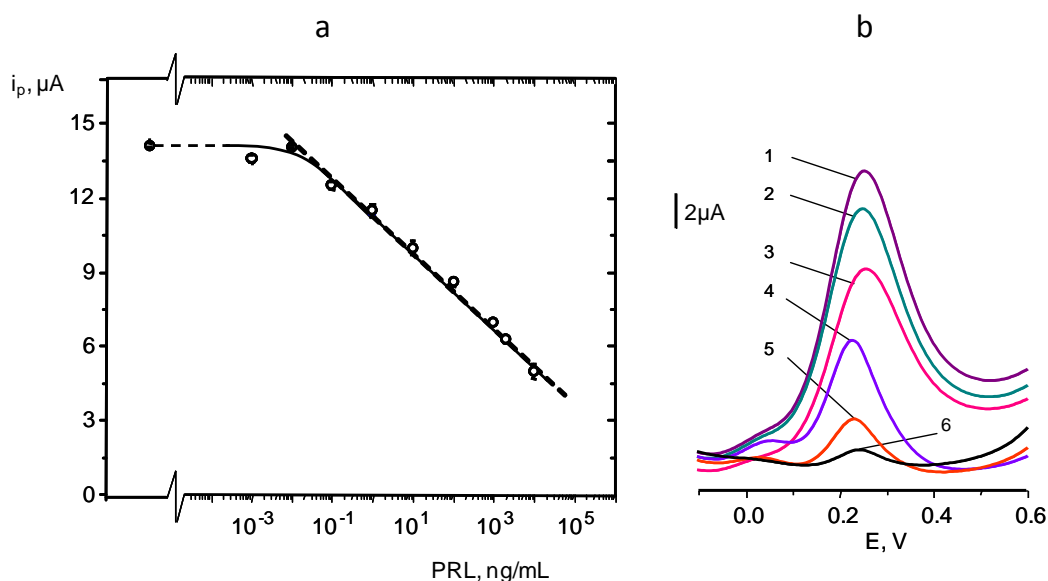


Figura 123.- (a) Calibrado para PRL con el inmunosensor AP-anti-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE; (b) respuestas en DPV: (1) 0; (2) 0.1; (3) 10; (4) 2.000; (5) 10.000 ng/mL PRL; (6) señal inespecífica.

En la Tabla 38 se han resumido las características analíticas del calibrado. Como puede observarse, la respuesta de corriente se ajusta a un intervalo lineal en un amplio margen de concentraciones comprendido entre 10^{-2} y 10^4 ng/mL, con una notable diferencia ($10 \mu\text{A}$) en la magnitud de la señal entre los valores más alto y más bajo de dicho intervalo. Es importante señalar que este intervalo es adecuado para la determinación de PRL en suero y en orina. Además, es significativamente mayor que los intervalos dinámicos que presentan los kits ELISA comerciales para este inmunoensayo (ver Tabla 12 en la Introducción), así como también a los de otros inmunosensores descritos en la bibliografía [Petrou, 2002; Moreno-Guzmán, 2011; Chen, 2012].

Tabla 38.- Características analíticas del método para la determinación de PRL con el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE

Característica	PRL
Intervalo lineal, ng/mL	$10^{-2} - 10^4$ ($r=0.999$)
Ecuación	$i_p, \mu A = (-1.40 \pm 0.02) \log C(\mu g/mL) + (6.93 \pm 0.07)$
Límite de detección, pg/mL	3
RSD, % (n=5) (el mismo día)	2.0
RSD, % (n=5) (distintos días)	2.6

El límite de detección se calculó como la concentración de hormona que producía una respuesta voltamperométrica igual a la del blanco menos tres veces la desviación estándar del blanco ($LOD = i_p(\text{blanco}) - 3s_b$). Dicha desviación, $s_b = \pm 0.07 \mu A$, se determinó a partir de diez medidas sucesivas de disoluciones preparadas sin PRL. Con este resultado, se obtuvo un valor de $LOD = 3 \text{ pg/mL}$, que es notablemente inferior a los obtenidos con otros inmunosensores [Petrou, 2002; Moreno-Guzmán, 2011; Chen, 2012].

5.4.2.3. Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad de las medidas se evaluó realizando voltamperogramas sucesivos de disoluciones de PRL de 0.01 ng/mL con distintos inmunosensores. Los valores de la desviación estándar relativa fueron del 2.0 % para las medidas realizadas en el mismo día (n=5), y del 2.6 % (n=5) para las registradas en diferentes días.

Finalmente, se investigó el tiempo de vida de la configuración desarrollada, preparando diferentes inmunoconjugados PRL-pPPA/MWCNTs/GCE que se almacenaron a 4°C en ambiente húmedo. A partir de ellos, cada día se construyeron inmunosensores AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE que se utilizaron para medir disoluciones de PRL de 0.1 ng/mL. Se observó que las corrientes de pico permanecían dentro del margen de ± 3 veces la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de trabajo (n=10), durante cinco días. La variación de corriente que se produce para tiempos más largos se debe probablemente a la inestabilidad de la hormona unida covalentemente a la superficie del electrodo.

Aunque este resultado pone de manifiesto una moderada estabilidad del inmunoconjugado, sin embargo se considera aceptable si se tiene en cuenta la posibilidad de preparación de inmunosensores en el momento a partir de varios inmunoconjugados almacenados previamente en las condiciones descritas.

5.4.2.4. Estudio de interferencias

Se estudió el efecto sobre la respuesta voltamperométrica del inmunosensor de diferentes especies que pueden estar presentes junto a la prolactina en las muestras suero u orina. Las especies ensayadas fueron testosterona, cortisol, estradiol, progesterona y hormona del crecimiento. Como puede observarse en la Figura 124, las señales obtenidas para disoluciones de 50 ng/mL de cada una de estas hormonas se compararon con la correspondiente al blanco en ausencia de PRL, observándose la ausencia de diferencias significativas entre ellas.

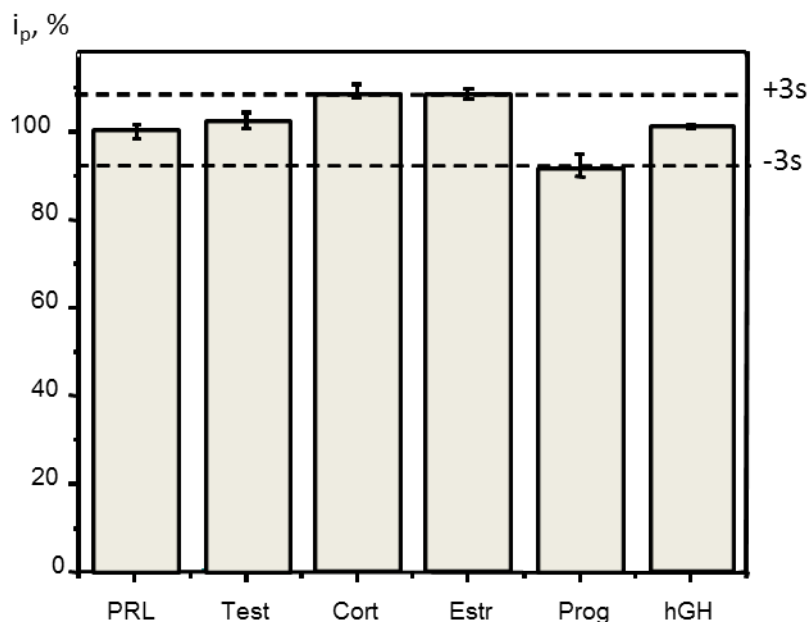


Figura 124.- Corrientes de pico medidas con el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/GCE en presencia de 0 ng/mL de PRL o de 50 ng/mL de testosterona (Test), cortisol (Cort), estradiol (Estr), progesterona (Prog) y hormona del crecimiento (hGH).

5.4.2.5. Aplicación a la determinación de PRL en suero humano y orina

La utilidad del inmunosensor para la determinación de PRL en muestras reales se demostró por aplicación al análisis de suero humano y orina, ambas enriquecidas con la hormona a niveles de concentración de interés clínico. En primer lugar se aplicó el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6.7. de la Parte Experimental a muestras de suero reconstituido contaminado con 0.1, 1.0 y 10 ng/mL de PRL. La posible existencia de efecto matriz se evaluó obteniendo un calibrado por dilución apropiada del suero, cuya ecuación fue $i_p, \mu A = (-1.47 \pm 0.19) \log C(\mu g/mL) + (7.05 \pm 0.6)$. La aplicación del test t de Student para un nivel de significación de 0.05 demostró que la pendiente de dicho calibrado no era significativamente diferente de la del calibrado externo, lo que demuestra la ausencia de efecto matriz en las condiciones de dilución empleadas. Este resultado indica, como en otros casos, que la determinación de PRL en el suero humano puede realizarse por interpolación de las corrientes de pico en el calibrado externo. Como puede apreciarse en la Tabla 39, los resultados obtenidos en el análisis por triplicado de las muestras a los diferentes niveles de concentración ensayados proporcionaron recuperaciones comprendidas entre el 97 y el 104 %.

Para la determinación de PRL en orina se siguió un procedimiento similar (ver Apdo. 4.6.7. de la Parte Experimental), si bien se tuvo en cuenta el valor de pH 5 de las muestras que hizo necesario un tratamiento previo de ajuste de pH a 7.4 por adición de hidróxido sódico diluido, seguido de filtración a través de un filtro de Nylon de 0.45 micras. En este caso, la ecuación del calibrado obtenido por dilución de las muestras fue $i_p, \mu A = (-1.47 \pm 0.07) \log C(\mu g/mL) + (7.1 \pm 0.2)$, observándose la similitud estadística con relación al calibrado externo, de igual forma al caso anterior. Los resultados de las determinaciones realizadas en orina a niveles de concentración de PRL de 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL se resumen en la Tabla 39. Como puede verse, también se obtuvieron buenas recuperaciones, con porcentajes que oscilan entre el 100 y el 103 %.

Tabla 39.- Determinación de PRL con el inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-pPPA/MWCNTs/ GCE

Puesto,ng/mL	Encontrado, ng/mL	Recuperación, %
Suero		
0.1	0.10± 0.01	100 ± 1
1.0	0.96 ± 0.03	97 ± 3
10.0	10.4 ± 0.6	104 ± 5
Orina		
0.01	0.01 ± 0.01	100 ± 4
0.10	0.103 ± 0.008	103 ± 1
1.0	1.02 ± 0.03	102 ± 3
10.0	10.0 ± 0.6	100 ± 1

5.4.2.6. Conclusiones

En este trabajo, la capacidad del ácido poli(pirrolpropílico) para la inmovilización covalente de biomoléculas combinada con la de los nanotubos de carbono para promover las reacciones de transferencia de carga hizo posible la construcción de un inmunosensor electroquímico para la determinación de prolactina con características analíticas mejoradas con respecto a otras configuraciones en términos de sensibilidad e intervalo dinámico. Además, el procedimiento de preparación del bioelectrodo se caracteriza por su simplicidad y menor coste que los de otros diseños. Finalmente, se demostró la utilidad del inmunosensor para el análisis de muestras clínicas, destacando por su relevancia, la orina, para la que no existían métodos de inmunoensayo.



Conclusiones/ Conclusions

Como conclusiones al trabajo expuesto a lo largo de esta Tesis Doctoral puede decirse:

1. Que se han desarrollado varias configuraciones originales de biosensores enzimáticos e inmunosensores electroquímicos empleando distintos tipos de materiales electrónicos y diferentes estrategias de inmovilización de biomoléculas. Las configuraciones descritas constituyen en algunos casos los primeros diseños de biosensores electroquímicos propuestos en la bibliografía o, en caso de existir, las características analíticas encontradas mejoran las de otras alternativas. Además, todos los biosensores han demostrado su utilidad por aplicación a muestras reales de interés alimentario o clínico.

2. Los biosensores enzimáticos para la determinación de glucosinolatos y de creatinina se han basado en electrodos compósitos preparados por mezcla de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y teflón. Este material ha demostrado ser apropiado para la inmovilización de las enzimas mirosinasa y glucosa oxidasa necesarias para la determinación de glucosinolatos, dando lugar a una mejora considerable de las características analíticas del método desarrollado respecto de otras configuraciones y otras metodologías más complejas. El diseño bienzimático se aplicó a la determinación de glucosinolatos totales en semillas de coles de Bruselas.

El material compósito ha permitido diseñar un biosensor multienzimático para la determinación de creatinina por incorporación a la pasta de la enzima auxiliar peroxidasa y el mediador ferroceno, seguido de la inmovilización de las enzimas creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa en su superficie con ayuda de una membrana de diálisis. Las características analíticas del biosensor resultante también compiten favorablemente con las de otros diseños propuestos en la bibliografía y su utilidad analítica ha sido demostrada por aplicación al análisis de suero humano con resultados concordantes con un método de referencia.

3. Se han desarrollado plataformas electrónicas basadas en el empleo del polímero conductor PEDOT para la construcción de biosensores enzimáticos e inmunosensores. En el primer caso, se han utilizado electrodos serigrafiados de carbono modificados con oro como superficies adecuadas para la electrogeneración del polímero y el atrapamiento de las enzimas, demostrando la posibilidad de utilizar líquidos iónicos puros como disolventes aptos tanto para

lograr la eficiente electropolimerización del monómero como la inmovilización de las enzimas alcohol deshidrogenasa o tirosinasa utilizadas para la preparación de los respectivos biosensores. Como aplicación, se llevó a cabo la determinación de etanol en cervezas con muy bajo contenido alcohólico.

Por otro lado, el inmunosensor sin marcador para la determinación simultánea de hormona del crecimiento y prolactina, es la primera configuración de este tipo descrita en la bibliografía. Se ha basado en la inmovilización de los anticuerpos correspondientes sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de PEDOT y de oro, y ha demostrado un comportamiento analítico excelente, debido a la elevada sensibilidad de la respuesta de oxidación de la dopamina, especie utilizada como sonda electroquímica, sobre este material. Además, este diseño ha sido aplicado con éxito a la determinación de ambas hormonas a bajos niveles de concentración en suero y saliva.

4. Por primera vez se ha desarrollado un inmunosensor electroquímico para hGH, basado en el empleo de partículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo para la inmovilización covalente estable del anticuerpo específico para dicha especie. El diseño de un esquema de tipo sandwich con un anticuerpo secundario y otro de detección marcado con fosfatasa alcalina hizo posible la puesta a punto de un método altamente sensible para esta hormona, con un límite de detección tres órdenes de magnitud más bajo que el obtenido mediante SPR, así como su aplicación al análisis de suero humano.

5. Se ha demostrado la utilidad de las superficies electrónicas modificadas con el polímero pPPA para la preparación de inmunosensores por inmovilización covalente de inmunorreactivos. Por un lado, se ha desarrollado por primera vez un inmunosensor para la hormona IGF1 mediante unión covalente del anticuerpo específico a la superficie de un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono y pPPA electrodepositado. Destaca la sensibilidad del método puesto a punto, haciendo uso de una configuración tipo sandwich, con un límite de detección más de cien veces inferior al valor más bajo de los inmunoensayos disponibles, así como su elevada estabilidad, con un periodo de vida de al menos dieciocho días.

Por otro lado, esta misma estrategia ha permitido construir un inmunosensor voltamperométrico para la determinación de prolactina haciendo uso de un esquema de

inmunoensayo competitivo indirecto por inmovilización covalente del propio antígeno sobre la superficie de dicho electrodo. La elevada sensibilidad del método desarrollado ha hecho posible la aplicación del inmunosensor al análisis de muestras de suero y de orina, destacando la especial relevancia de esta última, debido a la reciente propuesta de la prolactina urinaria como biomarcador de la preeclampsia y enfermedades relacionadas.

The conclusions of the research work made in this PhD Thesis can be summarized as:

1. Several original configurations of enzyme biosensors and immunosensors have been developed using various types of electrode materials and different strategies for biomolecule immobilization. The described devices are, in some cases the first designs of electrochemical biosensors proposed in the literature. In some other cases, the analytical performance of the developed biosensors improves remarkably that reported for other approaches. In addition, all the prepared biosensors have proved to be useful for application to real food or clinical samples.

2. Enzyme biosensors for the determination of glucosinolate or creatinine were prepared by constructing composite electrodes with carbon nanotubes, gold nanoparticles and Teflon. The composite material was suitable for the immobilization of the enzymes myrosinase and glucose oxidase employed for the determination of glucosinolates. The bioelectrodes allowed a considerable improvement of the analytical performance to be achieved when they were compared with other configurations and more complex methodologies. The bienzyme electrode was applied to the determination of total glucosinolates in seeds of Brussel strouts.

The same composite material was employed to design a multienzymatic biosensor for the determination of creatinine by incorporating peroxidase as auxiliary enzyme and ferrocene as mediator into the electrode material, and immobilizing the enzymes creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on the electrode surface using a dialysis membrane. The analytical characteristics of the resulting biosensor compete favorably with those reported for other electrode designs available in the literature. Furthermore, the multienzyme biosensor usefulness was demonstrated by the analysis of human serum and validation of the results with those provided by a reference analytical method.

3. Electrode platforms involving PEDOT conducting polymer have been used to construct enzyme biosensors and immunosensors. In the former case, screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles were used as appropriate surfaces for the electrogeneration of polymer and enzymes entrapment. In addition, pure ionic liquids were employed as suitable solvents to achieve both efficient monomer electropolymerization and

immobilization of enzymes. Alcohol dehydrogenase and tyrosinase were used for the preparation of the enzyme biosensors and the former one was applied to the determination of ethanol in alcohol-free beer.

A label-free immunosensor configuration for the simultaneous determination of human growth hormone (hGH) and prolactin was prepared for the first time. The approach involved the immobilization of the corresponding specific antibody on the surface of dual screen-printed carbon electrodes modified with PEDOT and gold nanoparticles. The dual immunosensor exhibited an excellent analytical behavior using the voltammetric oxidation response of dopamine as the electrochemical probe. The novel immunosensors design was successfully applied to the determination of both hormones at low concentration levels in human serum and saliva.

4. An electrochemical magnetoimmunosensor for hGH was developed using magnetic particles functionalized with tosyl moieties to covalently immobilize the hGH specific antibody in a stable way. The design of a sandwich-type immunoassay with a detection antibody labeled with alkaline phosphatase made possible this hormone to be detected with a detection limit three orders of magnitude lower than that obtained by Surface Plasmon Resonance. Moreover, it was applied to the analysis of human serum

5. Suitable pPPA (poly(pyrrole propionic) acid)-modified electrode surfaces were employed to design immunosensors by covalent immobilization of the immunoreagents. Following this approach, an immunosensor to determine the hormone IGF1 was prepared by covalent binding of the specific antibody to the surface of a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes and electrodeposited pPPA. It should be highlighted the excellent sensitivity of the method developed using a sandwich configuration, with a detection limit over one hundred times lower than that the lowest value achieved with commercial immunoassays, as well as the high stability observed, with a life time of at least eighteen days.

Moreover, this strategy has allowed building a voltammetric immunosensor for the determination of prolactin using an indirect competitive immunoassay involving covalent immobilization of the antigen on the surface of the above mentioned modified electrode. The high sensitivity of the developed methodology allowed the immunosensor application to the analysis of human serum and urine. This latter application is significantly relevant due to the recent proposal of urinary prolactin as a biomarker for preeclampsia and related diseases.

Bibliografía

A

- [Agüí, 2007] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Talanta*, 74, 412 (2007)
- [Agüí, 2007a] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electrochim. Acta*, 52, 7496 (2007)
- [Agüí, 2008] L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim Acta*, 622, 11 (2008)
- [Ahuja, 2007] T. Ahuja, I. A. Mir, D. Kumar, *Biomaterials*, 28, 791 (2007)
- [Al-Turki, 2003] A.I. Al-Turki, W.A. Dick, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 67 139 (2003)
- [Ares, 2014] A.M. Ares, M. J. Nozal, J. L. Bernal, J. Bernal, *Food Chem.*, 152, 66 (2014)
- [Armstrong, 1976] J. Armstrong, R.B. Barlow, *Br. J. Pharmacol.*, 57, 501 (1976)
- [Arvand, 2013] M. Arvand, M. Dehsaraei, *Mater. Sci. Eng., C* 33, 3474 (2013).
- [Atta, 2011] N.F. Atta, A. Galal, R. A. Ahmed, *Bioelectrochem.*, 80, 132 (2011)
- [Azevedo, 2005] A.M. Azevedo, D. M. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 235 (2005)

B

- [Bach, 2009] L.A. Bach, M.M. Rechler, *Diabetes/Metab.:Res.Rev.*, 8, 229 (2009)
- [Bello, 2007] A. Bello, M. Giannetto, G. Mori, R. Seeber, F. Terzi, C. Zanardi, *Sens. Actuators B*, 121, 430 (2007)
- [Bennett, 2004] R.N. Bennett, F.A. Mellon, P.A. Kroon, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 428 (2004)
- [Bennett, 2007] R.N. Bennett, R. Carvalho, F.A. Mellon, J. Eagles, E.A.S. Rosa, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 67 (2007)
- [Bernardi, 2003] R. Bernardi, M.G. Finiguerra, A.A. Rossi, S. Palmieri, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2737 (2003)
- [Bianchini, 2014] C. Bianchini, A. Curulli, M. Pasquali, D. Zane, *Food Chemistry*, 156, 81 (2014)
- [Bones, 2006] A.M. Bones, J.T. Rossiter, *Phytochem.*, 67, 1053 (2006)
- [Botting, 2002] C.H. Botting, N.E. Davidson, D.W. Griffiths, R.N. Bennett, N.P. Botting, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 983 (2002)
- [Bowes, 1997] Umpleby, M.H. Cummings, N.C. Jackson, P.V. Carroll, C.Lowy, P.H. Sonksen, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 243 (1997)
- [Bradfield, 1984] C.A. Bradfield, L.F. Bjeldanes, *Food Chem. Toxicol.*, 22, 977 (1984)
- [Braschi, 2011] Braschi, O. Leoni, S. Cinti, S. Palmieri, C.E. Gessa, *Plant Soil*, 339, 209 (2011)

- [Bringmann, 2005] G. Bringmann, I. Kajahn, C. Neusuess, M. Pelzing, S. Laug, M. Unger, U. Holzgrabe, *Electrophoresis*, 26, 1513 (2005)
- [Budnowski, 2013] J. Budnowski, F. S. Hanschen, C. Lehmann, M. Haack, R. Brigelius-Flohé, L. W. Kroh, M. Blaut, S. Rohn, L. Hanske, *Anal. Biochem.*, 441, 199 (2013)
- [Burmeister, 2000] W.P. Burmeister, S. Cottaz, P. Rollin, A. Vasella, B. Henrissat, *J. Biol. Chem.*, 275, 39385 (2000).



- [Calberg, 1996] C. Carlberg, X. Chen, O. Inganäs, *Solid State Ionics*, 85, 73 (1996)
- [Carralero, 2005] V. Carralero, M.L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 528, 1 (2005)
- [Carralero, 2006] V. Carralero, M.L. Mena, A. Gonzalez-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 730 (2006)
- [Centi, 2007] S. Centi, G. Marrazza, M. Mascini, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 49, 179 (2007)
- [Chakraborty, 2007] S. Chakraborty, C. Retna Raj, *Electrochem. Commun.*, 9, 1323 (2007)
- [Chang, 2012] L.-C. Chang, H.-N. Wu, C.-Y. Lin, Y.-H. Lai, C.-W. Hu, K. C. Ho, *Nanoscale Research Letters*, 7, 319 (2012)
- [Chen, 2010] W. Chen, Y. Lei, C.M. Li, *Electroanalysis*, 22, 1078 (2010).
- [Chen, 2012] H. Chen, Y. Cui, B. Zhang, B. Liu, G. Chen, D. Tang, *Anal. Chim. Acta*, 728, 18 (2012)
- [Chen, 2013] Y. Chen, P. Gai, L. Jin, D. Zhu, D. Tian, E. S. Abdel-Halim, J. Zhang, J.-J. Zhu, *J. Mater. Chem. B*, 1, 3451 (2013)
- [Cheng, 2009] Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, Y. Xian, W. Zhang, L. Jin, *Electrochim. Acta*, 54, 2588 (2009)
- [Chiu, 2009] J.-Y. Chiu, C.-M. Yu, M.-J. Yen, L.-C. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 2015 (2009)
- [Choi, 2007] H.N. Choi, Y.K. Lyu, J.H. Han, W.Y. Lee, *Electroanalysis*, 19, 1524 (2005)
- [Çubukçu, 2007] M. Çubukçu, S. Timur, Ü. Anik, *Talanta*, 74, 434 (2007)

D

- [Dalziel, 1966] K. Dalziel, F. Dickinson, *Biochem. J.*, 100, 34 (1966)
- [Darnaudery, 2006] M. Darnaudery, M. Perez-Martin, G. Belizaire, S. Maccari, L.M. Garcia-Segura, *Neurobiol. Aging*, 27, 119 (2006)
- [Díaz-González, 2006] M. Díaz-González, M. B. González-García, A. Costa-García, *Sens. Actuators B*, 113, 1005 (2006)
- [Dimitriadis, 1992] G. Dimitriadis, M. Parry-Billings, S. Bevan, D.B. Dunger, T. Piva, U. Krause, G. Wegener, E. Newsholme, *Biochem. J.*, 285, 269 (1992)
- [Dong, 2006] H. Dong, C.M. Li, W. Chen, Q. Zhou, Z.X. Zeng, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 78, 7424 (2006)
- [D'Orazio, 2003] P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta*, 41, 334 (2003)
- [Du, 2007] P. Du, S. Liu, P. Wu, C. Cai, *Electrochim. Acta*, 53, 1181 (2007).

E

- [Efimov, 2001] I. Efimov, S. Winkels, J.W. Schultze, *J. Electroanal. Chem.*, 499, 169 (2001)
- [Erlenkötter, 2002] A. Erlenkötter, M. Fobker, G. Chemnitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, 284 (2002)
- [Eshkenazi, 2000] I. Eshkenazi, E. Maltz, B. Zion, J. Rishpon, *J. Dairy Sci.*, 83, 1939 (2000)

F

- [Fahey, 1997] J.W. Fahey, Y. Zhang, P. Talalay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 10367 (1997)
- [Fedi, 2008] M. Fedi, L.A. Bach, S.F. Berkovic, J.O. Willoughby, I.E. Scheffer, D.C. Reutens, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 634 (2008)
- [Flint, 2003] D. J. Flint, N. Binart, J. Kopchick and P. Kelly, *Pituitary*, 6, 97 (2003)
- [Franzoi, 2009] A. C. Franzoi, I. C. Vieira, J. Dupont, C. W. Scheeren, L. F. de Oliveira, *Analyst*, 134, 2320 (2009)
- [Frechard, 2001] A. Frechard, N. Fabre, C. P'ean, S. Montaut, M.-T. Fauvel, P. Rollin, I. Fourast'e, *Tetrahedron Lett.*, 42, 9015 (2001)
- [Frystyk, 2004] J. Frystyk, *Growth Horm. IGF Res.*, 14, 337 (2004)

G

- [García-González, 2008] R. García-González, M.T. Fernández-Abedul, A. Pernía, A. Costa-García, *Electrochim. Acta*, 53, 3242 (2008)
- [Gholivand, 2011] M.H. Parvin, *J. Electroanal. Chem.*, 660, 163 (2011)
- [Ghoreishi, 2012] S. M. Ghoreishi, M. Behpour, M. Golestaneh, *Food Chem.*, 132, 637 (2012)
- [Groenendaal, 2000] L.B. Groenendaal, F. Jonas, D. Freitag, H. Pielartzik, J.R. Reynolds, *Adv. Mater.* 12, 481 (2000)
- [Guo, 1992] Z. Guo, T. Smith, E. Wang, N. Sadrieh, Q. Ma, P. Thomas, C. Yang, *Carcinogenesis*, 13, 2205 (1992)
- [Guo, 2005] W. Guo, L. Yuan, P. Chen, J. Guo, *Anal. Lett.*, 38, 343 (2005).

H

- [Heany, 1984] R.K. Heany, G.R. Fenwick, en "Methods of Enzymatic Analysis", 3ª ed; H.U. Bergmeyer, ed.; VCH: Weinheim; Vol. VI, 208 (1984)
- [Herzallah, 2012] S. Herzallah, R. Holley, *LWT - Food Sci. Technol.*, 47, 293 (2012)
- [Hosseini, 2014] H. Hosseini, S. Jamal, T. Rezaei, P. Rahmani, R. Sharifi, M. R. Nabid, A. Bagheri, *Sens. Actuators, B*, 195, 85 (2014)
- [Hsiue, 2004] G. Hsiue, P. Lu, J. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.*, 92, 3126, (2004)
- [Hu, 2011] Y. Hu, Z. Zhao, Q. Wan, *Bioelectrochem.*, 81, 59 (2011)
- [Hussain, 2008] W. Hussain, D.J. Pollard, M. Truppo, G.J. Lye, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 55, 19 (2008)

I

- [Innis, 2002] P.C. Innis, G.G. Wallace, *J. Nano Sci. Nanotech.*, 2, 441 (2002)
- [Ispas, 2009] A. Ispas, R. Peipmann, A. Bund, I. Efimov, *Electrochim. Acta*, 54, 4668 (2009)
- [Ito, 2000] S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta*, 424, 57 (2000).

J

- [Jaffé, 1880] M. Jaffe, Z. *Physiol. Chemie*, 10, 391 (1880)
[Jiao, 1994] D. Jiao, K.I. Ecklund, C.I. Choi, D.H. Desai, S.G. Amin, F.L. Chung, *Cancer Res.*, 54, 4327 (1994)
[Jones, 1995] J.I. Jones, D.R. Clemmons, *Endocrine Rev.*, 16, 3 (1995)
[de Juan-Franco, 2013] E. de Juan-Franco, J.M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, L. M. Lechuga, *Talanta*, 114, 268 (2013)
[Ju, 2002] H. Ju, S. Liu, B. Ge, F. Lisdat, F. W. Scheller, *Electroanalysis*, 14, 141 (2002)

K

- [Kausaite-Minkstimiene, 2013] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanavicius, J. Ruksnaite, *Anal. Meth.* 5, 4757 (2013)
[Khan, 1997] G.F. Khan, W. Wernet, *Anal. Chim. Acta*, 351, 151 (1997)
[Kiddle, 2001] G. Kiddle, R.N. Bennett, N.P. Botting, N.E. Davidson, A.A.B. Robertson, R.M. Wallsgrove, *Phytochem. Anal.*, 12, 226 (2001)
[Kim, 1999] E. Kim, T. Haryama, Y. Yanagida, E. Kobatake, M. Aizawa, *Anal. Chim. Acta*, 394, 225 (1999)
[Killard, 2000] A.J. Killard, M.R. Smyth, *Trends Biotechnol.* 18, 433 (2000)
[Kokkonen, 1991] P.S. Kokkonen, J. van der Greef, W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, G.J. ten Hove, G. van de Werken, *Biol. Mass Spectrom.*, 20, 259 (1991)
[Kuang, 2013] P. Kuang, D. Song, Q. Yuan, X. Lv, D. Zhao, H. Liang, *Food Chemistry*, 136, 309 (2013)
[Kumar, 2005] S. S. Kumar, J. Mathiyasaru and K. L. Phani, *J. Electroanal. Chem.*, 578, 95 (2005)
[Kumar, 2006] S.S. Kumar, J. Mathiyasaru, K.L.N. Phani, V. Yegnamaran, *J. Solid State Electrochem.*, 10, 905 (2006)
[Kumar, 2010] S.A. Kumar, S.-F. Wang, Y.-T. Chang, *Thin Solid Films*, 518, 5832 (2010)
[Kushad, 1999] M.M. Kushad, A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, E.H. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1541 (1999)

L

- [Lad, 2008] U. Lad, S. Khokhar, G.M. Kale, *Anal. Chem.*, 80, 7910 (2008)
- [Lee, 2009] C.A. Lee, Y.C. Tsai, *Sens. Actuat. B*, 138, 518 (2009)
- [Lee, 2010] I. Lee, M. C. Boyce, M. C. Breadmore, *Anal. Chim. Acta*, 663, 105 (2010)
- [Leoni, 1991] O. Leoni, R. Iori, S. Palmieri, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2322 (1991)
- [Le Roith, 2001] D. Le Roith, C. Bondy, S. Yakar, J.L. Liu, A. Butler, *Endocrine Rev.*, 22, 53 (2001)
- [Lewitt, 1994] M.S. Lewitt, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 23, 3 (1994)
- [Li, 2006] Y. F. Li, Z. M. Liu, Y. L. Liu, Y. H. Yang, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Anal. Biochem.*, 349, 33 (2006)
- [Li, 2013] Z. Li, Y. Huang, L. Chen, X. Qin, Z. Huang, Y. Zhou, Y. Meng, J. Li, S. Huang, Y. Liu, W. Wang, Q. Xie, S. Yao, *Sens. Actuators B*, 181, 280 (2013)
- [Lin, 2009] C.-Y. Lin, V.S. Vasantha, K.-C. Ho, *Sens. Actuators B*, 140, 51 (2009)
- [Lin, 2010] K.-C. Lin, T.-H. Tsai, S.-M. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 26, 608 (2010)
- [Ling, 2003] C. Ling, L. Svensson, B. Oden, B. Weijdegard, B. Eden, S. Eden and H. Billig, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 1804 (2003)
- [Liu, 2002] S.-Q. Liu, H.-X. Ju, *Anal. Biochem.*, 307, 110 (2002)
- [Liu, 2003] S. Liu, J. Yu, H. Ju, *J. Electroanal. Chem.*, 540, 6 (2003)
- [Liu, 2003a] S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.*, 19, 177 (2003)
- [Liu, 2003b] S. Liu, H. Ju, *Electroanalysis*, 15, 1488 (2003)
- [Liu, 2006] Y.C. Liu, K.H. Yang, *Electrochim. Acta*, 51, 5376 (2006)
- [Liu, 2007] S. Liu, C. Cai, *J. Electroanal. Chem.*, 602, 103 (2007)
- [Liu, 2010] X. Liu, X. Zeng, N. Mai, Y. Liu, B. Kong, Y. Li, W. Wei, S. Luo, *Biosens. Bioelectron.* 25, 2675 (2010)
- [Liu, 2011] M. Liu, Y. Wen, D. Li, R. Yue, J. Xu, Haohua He, *Sens. Actuators B*, 159, 277 (2011)
- [Low, 1991] L.C. Low, *Neuroendocrinol.*, 53, 37 (1991)
- [Lu, 2008] Q. Lu, C. M. Li, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 767 (2008)
- [Lu, 2010] L. Lu, L. Zhang, X. Zhang, S. Huan, G.i Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta*, 665, 146 (2010)

M

- [Manesh, 2008] K.M. Manesh, P. Santosh, A. Gopalan, K.P. Lee, *Talanta*, 75, 1307 (2008)
- [Manici, 1997] L. M. Manici, L. Lazzeri, S. Palmieri, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2768 (1997)
- [Manisankar, 2005] P. Manisankar, S. Viswanathan, A. M. Pusphalatha, C. Rani, *Anal. Chim. Acta*, 528, 157 (2005)
- [Manso, 2007] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* 603, 1 (2007)
- [Manso 2008] J. Manso, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Electrochim. Acta*, 53, 4007 (2008)
- [Marazuela, 1999] M. Marazuela, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis*, 11, 1333 (1999)
- [Mari, 1996] M. Mari, R. Iori, O. Leoni, A. Marchi, *Plant Pathol.*, 45, 753 (1996)
- [Marquette, 2006] C.A. Marquette, L.J. Blum, *Biosens. and Bioelectron.*, 21, 1424 (2006)
- [Martinez, 1993] M. Martinez, J.L. Rodicio, J. Herrera, *Tratado de Nefrología*, Cap. 29, 521, Ed. Norma S.L. España (1993)
- [Mathiyarasu, 2008] J. Mathiyarasu, S. Senthilkumar, K.L.N. Phani, V. Yegnaraman, *Mater. Lett.*, 62, 571 (2008)
- [Mehretie, 2012] S. Mehretie, S. Admassie, M. Tessema, T. Solomon, *Sens. Actuators B*, 168, 97 (2012)
- [Melato, 2008] A.I. Melato, A.S. Viana, L.M. Abrantes, *Electrochim. Acta*, 54, 590 (2008)
- [Mellon, 2002] F.A. Mellon, R.N. Bennett, B. Holst, G. Williamson, *Anal. Biochem.*, 306, 83 (2002)
- [Mena, 2007] M.L. Mena, V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 87, 57 (2007)
- [Meyerhoff, 1976] M. Meyerhoff, G.A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, 85, 277 (1976)
- [Milner, 1999] A. Milner, *J. Nutr.*, 129, 1295 (1999)
- [Miscoria, 2005] S. A. Miscoria, G.D. Barrera, G. A. Rivas, *Electroanalysis*, 17, 1578 (2005)
- [Miura, 1992] Y. Miura, H. Kato, T. Noguchi, *Brit. J. Nutr.*, 67, 257 (1992)
- [Mohabbati-Kalejahi, 2012] E. Mohabbati-Kalejahi, V. Azimirad, M. Bahrami, A. Ganbari, *Talanta*, 97, 1 (2012)
- [Mondal, 2007] M. Mondal, C. Rajkhowa, B.S. Prakash, *Anim. Repr. Sci.*, 99, 182 (2007)
- [Moreno-Guzmán, 2011] M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal.Chim. Acta* 692, 125 (2011)
- [Moreno-Guzmán, 2013] M. Moreno-Guzmán, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *J. Solid State Electrochem.*, 17, 1591 (2013)

[Morse, 1989] M.A. Morse, C.X. Wang, G.D. Stoner, S.G. Mandal, P.B. Conran, S.G. Amin, S.S. Hecht, F.L. Chung, *Cancer Res.*, 49, 549 (1989)

[Mullington, 1996] J. Mullington, D. Hermann, F. Holsboer, T. Pollmächer, *Neuroendocrinol.*, 64, 233 (1996)

N

[Nieh, 2013] C.H. Nieh, S. Tsujimura, O. Shirai, K. Kano, *Anal. Chim. Acta*, 767, 128, (2013)

[Nien, 2006] P.-C. Nien, T.-S. Tung, K.-C. Ho, *Electroanalysis*, 18, 1408 (2006)

[Nijhoff, 1995] W.A. Nijhoff, M.J. Grubben, F.M. Nagengast, J.B. Jansen, H. Verhagen, G. Vanpoppel, W.H. Peters, *Carcinogenesis*, 16, 2125 (1995)

O

[Oungpipat, 1995] W. Oungpipat, P.W. Alexander, P. Southwell-Keely, *Anal. Chim. Acta*, 309, 35 (1995).

P

[Pan, 2005] D. Pan, J. Chen, S. Yao, L. Nie, J. Xia, W. Tao, *Sens. Actuat. B*, 104, 68 (2005)

[Pathipati, 2011] P. P. Pathipati, T. Gorba, A. Scheepens, V. Goffin, Y. Sun and M. Fraser, *Neuroscience*, 190, 409 (2011)

[Petrou, 2002] P.S. Petrou, S.E. Kakabako, I. Christofidis, P. Argitis, K. Misiakos, *Biosens. Bioelectron.*, 17, 261 (2002)

[Pingarrón, 1999] J.M. Pingarrón, P. Sánchez, "Química Electroanalítica: fundamentos y aplicaciones". Ed. Síntesis S.A., Madrid, (1999)

[Pingarrón, 2008] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, *Electrochim. Acta*, 53, 5848 (2008)

[Popii, 2004] V. Popii, G. Baumann, *Clin. Chim. Acta* 350, 1 (2004)

[Pretera, 1996] T. Pretera, J.W. Fahey, W.D. Hotzclaw, C. Abeygunawardana, J.L. Kachinski, P. Talalay, *Anal. Biochem.*, 239, 168 (1996)

R

- [Radomska, 2004] E. Radomska, E. Bodenszac, S. Glab, R. Koncki, *Talanta*, 64, 603 (2004)
- [Rajesh, 2009] T. Rajesh, D. Ahuja, S. Kumar, *Sens. Actuators B*, 136, 275 (2009)
- [Ramanavicius, 2005] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, *Sens. Actuators B*, 111–112, 532 (2005)
- [Rezaei, 2009] B. Rezaei, T. Khayamian, N. Majidi, H. Rahmani, *Biosens. Bioelectron.* 25, 395 (2009)
- [Rezaei, 2011] B. Rezaei, N. Majidia, H. Rahmani, T. Khayamian, *Biosens. Bioelectron.*, 26, 2130 (2011)
- [Rochfort, 2006] S. Rochfort, D. Caridi, M. Stinton, V. C. Trenerry, R. Jones, *J. Chromatogr. A*, 1120, 205, (2006)
- [Roy, 2007] K.S. Roy, B.S. Prakash, *Theriogenology*, 67, 572, (2007).

S

- [Sakslund, 1992] H. Sakslund, O. Hammerich, *Anal. Chim. Acta.*, 268, 331 (1992)
- [Salimi, 2010] A. Salimi, S. Lasghari, A. Noorbakhash, *Electroanalysis*, 22, 1707 (2010)
- [Sanghavi, 2011] B.J. Sanghavi, A.K. Srivastava, *Anal. Chim. Acta*, 706, 246 (2011)
- [Sanghavi, 2013] B.J. Sanghavi, S. Sitaula, M.H. Griep, S.P. Karna, M.F. Ali, N. S. Swuami, *Anal. Chem.*, 85, 8158 (2013)
- [Santos, 2003] A.S. Santos, R.S. Freire, L.T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.*, 547, 135 (2003)
- [Santos, 2006] A.S. Santos, A.C. Pereira, N. Durán, L.T. Kubota, *Electrochim. Acta*, 52, 215 (2006)
- [Santosh, 2009] P. Santhosh, K.M. Manesh, S. Uthayakumar, S. Komathi, A.I. Gopalan, K.-P. Lee, *Bioelectrochem.*, 75, 61 (2009)
- [Santosh, 2009] P. Santhosh, K.M. Manesh, S. Uthayakumar, S. Komathi, A.I. Gopalan, K.-P. Lee, *Bioelectrochem.*, 75, 61 (2009)
- [Sarkar, 2006] M. Sarkar, B.S. Prakash, *Theriogenology*, 65, 499 (2006)
- [Şenel, 2010] M. Senel, E. Cevik, M.F. Abasiyanik, *Sens. Actuators B*, 145, 444 (2010)
- [Şenel, 2012] M. Şenel, C. Nergiz, *Curr. Appl. Phys.*, 12, 1118 (2012)
- [Serra, 2002] Serra, B. "Tesis Doctoral". Universidad Complutense de Madrid, (2002)
- [Shan, 2010] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, *Biosens. Bioelectron.*, 25, 1504 (2010)
- [Shang, 2009] F. Shang, Y. Liu, S. Hrapovic, J.D. Glennon, J.H.T. Luong, *Analyst*, 134, 519 (2009)

- [Shankaranarayana, 1982] M.L. Shankaranarayana, B. Raghaven, K.O. Abraham, C.P. Natarajan, en "Food Flavors", I.D. Morton, A.J. MacLeod, 1982, 169 (1982)
- [Shih, 1999] Y.T. Shih, H.J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 392, 143 (1999)
- [Shin, 2001] J. Shin, Y. Choi, H. Lee, S. Choi, J. Ha, I. Yoon, H. Nam, G. Cha, *Anal. Chem.* 73, 5965 (2001)
- [Siedel, 1984] J. Siedel, H. Mollering, J. Zieghorn, *Clin. Chem.*, 30, 968 (1984)
- [Sinha, 1995] Y.N. Sinha, *Endocr. Rev.*, 16, 354 (1995)
- [Song, 2005] L. Song, J.J. Morrison, N.P. Botting, P.J. Thornalley, *Anal. Biochem.*, 347, 234 (2005)
- [Souter, 2010] I. Souter, L.M. Baltagi, T.L. Toth, J.C. Petrozza, *Fertil. Steril.*, 94, 1159 (2010)
- [Spain, 2013] E. Spain, T.E. Keyes, R. J. Forster, *Biosens. Bioelectron.*, 41, 65 (2013)
- [Stançik, 1995] L. Stançik, L. Machokin, I. Pluhaček, F. Scheller, *Electroanalysis*, 7, 726 (1995)
- [Stefan, 2000] R.I. Stefan, J.F. van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *J. Anal. Chem.*, 366, 659 (2000)
- [Stoner, 1991] G.D. Stoner, D.T. Morrisey, Y.H. Heur, E.M. Daniel A,J, Galati, S.A. Wagner, *Cancer Res.*, 51, 2063 (1991)
- [Szmigielska, 2000] A.M. Szmigielska, J.J. Schoenau, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5190, (2000)

T

- [Takahashi, 1968] Y. Takahashi, D. M. Kipnis and W. H. Daughaday, *J. Clin. Invest.*, 47, 2079 (1968)
- [Tawfiq, 1995] N. Tawfiq, R.K. Heaney, J.A. Plumb, G.R. Fenwick, S.R. Musk, G. Williamson, *Carcinogenesis*, 16, 1191 (1995)
- [Teymourian, 2012] H. Teymourian, A. Salimi, R. Hallaj, *Talanta* 90, 91 (2012)
- [Thies, 1997] W. Thies, *Z. Pflanzenzuchtg*, 79, 331, (1997)
- [Tombach, 2001] J. Tombach, F. Schneider, R. Matzkies, G. C. Schaefer, *Clin. Chim. Acta*, 312, 129 (2001)
- [Trenerry, 2006] V. C. Trenerry, D. Caridi, A. Elkins, O. Donkor, R. Jones, *Food Chem.*, 98, 179 (2006)
- [Treviño, 2009] J. Treviño, A. Calle, J.M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, L.M. Lechuga, *Talanta*, 78, 1011 (2009)
- [Treviño, 2009a] J. Treviño, A. Calle, J.M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, L.M. Lechuga, *Clin. Chim. Acta*, 403, 56 (2009)
- [Tripathi, 2001] M.K. Tripathi, I.S. Agrawal, S. D. Sharma, D.P. Mishra, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 92, 73 (2001)
- [Tripathi, 2006] V.S. Tripathi, V.B. JKandimalla, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 1529 (2006)
- [Tripathi, 2007] M.K. Tripathi, A.S. Mishra, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 132, 1 (2007)

- [Truong, 2011] L.T.N. Truong, M. Chikaea, Y. Ukita, Y. Takamura, *Talanta*, 85, 2576 (2011)
- [Tsai, 2007] Y.C. Tsai, J.D. Huang, C.C. Chiu, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 3051 (2007)
- [Tsai, 2007a] Y.C. Tsai, C.C. Chiu, *Sens. Actuat. B*, 125, 10 (2007)
- [Tsiafoulis, 2003] C.G. Tsiafoulis, M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis, *Anal. Chem.*, 75, 927, (2003)
- [Tsuchida, 1983] T. Tsuchida, K. Yoda, *Clin. Chem.*, 29, 51 (1983)
- [Turkarlan, 2010] O. Turkarlan, A.E. Boyukbayram, L. Toppare, *Synth. Met.* 160, 808 (2010)

V

- [Van Cauter, 2004] E. Van Cauter, F. Latta, A. Nedeltcheva, K. Spiegel, R. Leproult, C. Vandenbril, R. Weiss, J. Mockel, J.J. Legros, G. Copinschi, *Growth Horm. IGF Res.*, 14, S-10 (2004)
- [Velasco – García, 2003] M.N. Velasco-García, T. Mottram, *Biosystems Eng.*, 84, 1 (2003)
- [Velcheti, 2006] V. Velcheti, R. Govindan, *J. Thoracic Oncol.*, 1, 607 (2006)
- [Verkerk, 2001] R. Verkerk, M. Dekker, W.M.F. Jongen, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 953 (2001).

W

- [Wagner, 2005] K. Wagner, J.M. Pringle, S.B. Hall, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, D.L. Officer, *Synth. Met.* 153, 257 (2005)
- [Wallig, 2002] M.A. Wallig, R.L. Belyea, M.E. Tumbleson, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 99, 205 (2002)
- [Walsh, 2002] D. Walsh, E. Dempsey, *Anal. Chim. Acta*, 459, 187 (2002)
- [Wang, 2008] H. Wang, G. Shen, R. Yu, *Biosensors and their Biomedical Applications*, 9, 237 (2008)
- [Wang, 2008a] S. Wang, Y. Tan, D. Zhao, G. Liu, *Biosens. Bioelectron.* 23, 1781 (2008)
- [Wattenberg, 1977] L.W. Wattenberg, *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 395 (1977)
- [Wattenberg, 1978] L.W. Wattenberg, W.D. Loub, *Cancer Res.*, 38, 1410 (1978)
- [Weber, 1991] J.A. Weber, A.P. van Zanten, *Clin. Chem.*, 37, 695 (1991)
- [Wen, 1999] X. L. Wen, Y. H. Jia, Z. L. Liu, *Talanta*, 50, 1027 (1999)
- [Wenbo, 2000] H. Wennbo, J. T'ornell, *Oncogene*, 19, 1072 (2000)
- [Wren, 2000] A. M. Wren, C.J. Small, H.L. Ward, K.G. Murphy, C.L. Dakin, S. Taheri, A.R. Kennedy, G.H. Roberts, D.G. Morgan, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, *Endocrinol.*, 141, 4325 (2000)
- [Wu, 2005] B. Wu, G. Zhang, S. Shuangm C. Dong, M.M.F. Choi, A.W.M. Lee, *Sens. Actuators B*, 106, 700 (2005)
- [Wu, 2007] L. Wu, X. Zhang, H. Ju, *Anal. Chem.*, 79, 454 (2007).

X

- [Xiao, 1999] Y. Xiao, H.-X. Ju, H.-Y. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 391, 1, 73 (1999)
- [Xiao, 2013] X. Xiao, M. Wang, H. Li, P. Si, *Talanta*, 116, 1054 (2013)
- [Xu, 2010] Y. Xu, C. Hu, S. Hu, *Sens. Actuators B*, 148, 253 (2010)
- [Xu, 2013] G. Xu, B. Li, X. T. Cui, L. Ling, X. Luo, *Sens. Actuators B*, 188, 405 (2013)

Y

- [Yadav, 2011] S. Yadav, A. Kumar, C.S. Pundir, *Anal. Biochem.*, 419, 277 (2011)
- [Yadav, 2011a] S. Yadav, R. Devi, A. Kumar, C.S. Pundir, *Biosens. Bioelectron.*, 28, 64 (2011)
- [Yadav, 2012] S. Yadav, R. Devi, P. Bhar, S. Singhla, C.S. Pundir, *Enzym. Microbial Technol.*, 50, 247 (2012)
- [Yang, 2009] D.W. Yang, H.H. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, 25, 733 (2009)
- [Yang, 2009a] Z. Yang, Y.-J. Yue, W.C. Huang, X.M. Zhuang, M. Xing, *J. Biochem.*, 145, 355 (2009)
- [Yáñez-Sedeño, 2014] P. Yáñez-Sedeño, L. Agüí, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 823, 1 (2014)
- [Yeap, 2012] B.B. Yeap, S.A.P. Chubb, K.A. McCauk, L. Flicker, K.K.Y. Ho, J. Golledge, G.J. Hankey, P.E. Norman, *Eur. J. Endocrinol.*, 166, 191 (2012)
- [Yeh, 2005] W.-M. Yeh, K.-C. Ho, *Anal. Chim. Acta*, 542, 76 (2005)
- [Yoshimoto, 1976] T. Yoshimoto, I. Oka, D. Tsuru, *J. Biochem*, 79, 1381 (1976)
- [Yuanyuan, 2006] H. Yuanyuan, D. Shan, S. Wang, H. Xue, H. Zheng, *Analytical Biochemistry*, 356, 215 (2006)

Z

- [Zacco, 2007] E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, *Biosens. and Bioelectron.* 22, 2184 (2007)
- [Zhang, 1992] Y. Zhang, P. Talalay, C.G. Cho, G.H. Posner, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 2399 (1992)
- [Zhang, 1994] Y. Zhang, T.W. Kensler, C.G. Cho, G.H. Posner, P. Talalay, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3147 (1994)
- [Zhang, 2012] L. Zhang, X. Duan, Y. Wen, J. Xu, Y. Yao, Y. Lu, L. Lu, O. Zhang, *Electrochim. Acta*, 72, 179 (2012)
- [Zhang, 2014] K. Zhang, J. Xu, X. Duan, L. Lu, D. Hu, L. Zhang, T. Nie, K. B. Brown, *Electrochim. Acta*, 137, 518 (2014)
- [Zheng, 2008] D. Zheng, H. Li, B. Lu, Z. Xu, H. Chen, *Thin Solid Films*, 516, 2151 (2008)
- [Zrybko, 1997] C.L. Zrybko, E.K. Fukuda, R.T. Rosen, *J. Chromatogr. A*, 767, 43 (1997).



Publicaciones



Full Paper

Glucosinolate Amperometric Bienzyme Biosensor Based on Carbon Nanotubes-Gold Nanoparticles Composite Electrodes

V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño,* José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040-Madrid, Spain
*e-mail: yseo@quim.ucm.es

Received: January 26, 2009

Accepted: March 15, 2009

Abstract

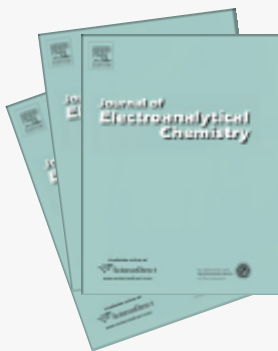
A novel electrochemical biosensor design for glucosinolate determination involving bulk-incorporation of the enzymes glucose oxidase and myrosinase into a colloidal gold - multiwalled carbon nanotubes composite electrode using Teflon as binder is reported. Myrosinase catalyzes the hydrolysis of glucosinolate forming glucose, which is enzymatically oxidized. The generated hydrogen peroxide was electrochemically detected without mediator at the nanostructured composite electrode at $E = +0.5$ V vs. Ag/AgCl. Under the optimized conditions, the bienzyme MYR/GOx-Au_{col}-MWCNT-Teflon exhibited improved analytical characteristics for the glucosinolate sinigrin with respect to a biosensor constructed without gold nanoparticles, i.e. a MYR/GOx-MWCNT-Teflon electrode, as well as with respect to other glucosinolate biosensor designs reported in the literature. The biosensor exhibits good repeatability of the amperometric measurements and good interassay reproducibility. Furthermore, the biosensor exhibited a high selectivity with respect to various potential interferents. The usefulness of the biosensor was evaluated by the determination of glucosinolate in Brussel sprout seeds.

Keywords: Gold nanoparticles, Carbon nanotubes, Glucosinolate bienzyme amperometric biosensor, Biosensors, Nanotubes

DOI: 10.1002/elan.200904574

Electroanalysis, 21(13) (2009) 1527-1532





A novel hybrid platform for the preparation of disposable enzyme biosensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodeposition in an ionic liquid medium onto gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes

V. Serafín, 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 15 September 2010

Received in revised form 26 November 2010

Accepted 29 November 2010

Available online 7 December 2010

Keywords:

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

Gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes

Ionic liquids

NADH

Alcohol dehydrogenase

Tyrosinase

ABSTRACT

A novel electrochemical platform for the preparation of disposable enzyme biosensors is reported in this work. This platform is constructed by electrodeposition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) using the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIMPF₆) as the electropolymerization solvent onto gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (SPCE). The enzymes alcohol dehydrogenase (ADH) or Tyrosinase were entrapped onto the electrode surface during the electropolymerization step. The potentiostatic electropolymerization process of PEDOT on gold nanoparticles-modified SPCE was optimized and the resulting modified electrodes characterized voltammetrically and by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The NADH amperometric detection at PEDOT/nAu/SPCE was also optimized and compared with that produced at a PEDOT/SPCE. ADH/PEDOT/nAu/SPCEs were constructed. The measured current for ethanol was 30% larger than that obtained using ADH/PEDOT/SPCEs. At a detection potential of +300 mV, a calibration graph for ethanol with a linear range between 5 and 100 μ M was obtained with a detection limit of 2 μ M. The PEDOT/nAu/SPCEs electrodes were also tested for the preparation of Tyrosinase biosensors. Using a detection potential of -150 mV, a linear calibration graph for phenol was constructed over the 0.1-50 μ M concentration range, with a limit of detection of 0.02 μ M.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

J. Electroanal. Chem. 656 (2011) 152 - 158





Anal Bioanal Chem (2012) 403:939–946
DOI 10.1007/s00216-012-5753-9

ORIGINAL PAPER

Ultrasensitive determination of human growth hormone (hGH) with a disposable electrochemical magneto-immunosensor

V. Serafin · N. Úbeda · L. Agüí · P. Yáñez-Sedeño ·
J. M. Pingarrón

Received: 7 December 2011 / Revised: 12 January 2012 / Accepted: 13 January 2012 / Published online: 30 January 2012
© Springer-Verlag 2012

Anal. Bioanal. Chem. 403 (2012) 939 - 946





Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode



V. Serafín, P. Hernández, L. Agúí, 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 17 December 2012

Received in revised form 12 February 2013

Accepted 2 March 2013

Available online 13 March 2013

Keywords:

Creatinine

Electrochemical biosensor

Gold nanoparticles

Carbon nanotubes

Composite electrodes

ABSTRACT

A composite electrode consisted of gold nanoparticles (AuNPs), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and Teflon, to which peroxidase (HRP) and ferrocene (Fc) were incorporated as auxiliary enzyme and redox mediator, respectively, was constructed. The enzymes creatininase, creatinase and sarcosine oxidase were then co-immobilized onto the surface of the resulting HRP/Fc/AuNPs/MWCNTs/Teflon electrode for the preparation of a creatinine biosensor. Amperometry in stirred solutions using a detection potential of 0.0 V vs Ag/AgCl allowed a linear calibration plot to be obtained in the 0.003–1.0 mM creatinine concentration range with a limit of detection of 0.1 μ M (S/N=3). The apparent Michaelis-Menten constant for creatininase was $K_M^{app} = 4.1 \pm 0.4$ mM. The developed biosensor was validated with good results by determining creatinine in human serum and correlating with the spectrophotometric Jaffe's method.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Electrochim. Acta, 97 (2013) 175 - 183





Electrochemical immunosensor for the determination of insulin-like growth factor-1 using electrodes modified with carbon nanotubes–poly(pyrrole propionic acid) hybrids



V. Serafín, 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 27 June 2013

Received in revised form

9 August 2013

Accepted 13 August 2013

Available online 29 August 2013

Keywords:

Insuline-like growth factor 1

Electrochemical immunosensor

Poly(pyrrole propionic acid)

ABSTRACT

An amperometric immunosensor for the determination of the hormone insulin-like growth factor 1 (IGF1) is reported for the first time in this work. As electrochemical transducer, a multiwalled carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode on which poly(pyrrole propionic acid) was electropolymerized was prepared. This approach provided a high content of surface confined carboxyl groups suitable for direct covalent binding of anti-IGF1 monoclonal antibody. A sandwich-type immunoassay using a polyclonal antibody labeled with peroxidase, hydrogen peroxide as the enzyme substrate and catechol as redox mediator was employed to monitor the affinity reaction. All the variables involved in the preparation of the modified electrode were optimized and the electrodes were characterized by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. Moreover, the different experimental variables affecting the amperometric response of the immunosensor were also optimized. The calibration graph for IGF1 showed a range of linearity extending from 0.5 to 1000 pg/mL, with a detection limit, 0.25 pg/mL, more than 100 times lower than the lowest values reported for the ELISA immunoassays available for IGF1 (30 pg/mL, approximately). Excellent reproducibility for the measurements carried out with different immunosensors and selectivity against other hormones were also evidenced. A commercial human serum spiked with IGF1 at different levels between 0.01 and 10.0 ng/mL was analyzed with good results.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Biosens. & Bioelectron. 52 (2014) 98 - 104





Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes



V. Serafín, L. Agúí, 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 11 December 2013

Accepted 19 January 2014

Available online 30 January 2014

Keywords:

Electrochemical immunosensor

Prolactin

Urine

Human serum

Poly(pyrrolepropionic acid)

Hybrid nanomaterials

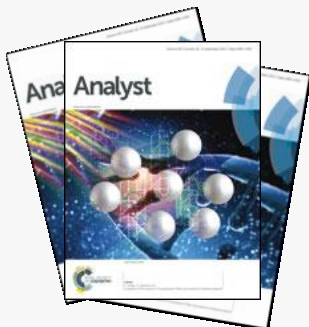
ABSTRACT

A novel electrochemical immunosensor for the determination of the hormone prolactin (PRL) is reported by using glassy carbon electrodes modified with a poly(pyrrolepropionic acid)/multiwalled carbon nanotubes hybrid nanomaterial as transducer. An indirect competitive assay was utilized where the antigen was covalently immobilized on the modified electrode and a fixed amount of anti-PRL labelled with alkaline phosphatase (AP) was reacted with PRL in the sample. After attachment of the remaining labelled antibody to the immobilized PRL, the affinity reaction was monitored by differential pulse voltammetry of the AP enzyme reaction product using 1-naphtyl phosphate as substrate. Upon optimization of the variables affecting the immunosensor behaviour, a calibration graph for PRL with a wide linear range between 10^{-2} and 10^4 ng/mL was obtained. The calculated LOD value, 3 pg/mL resulted to be remarkably lower than those reported previously using other approaches. Moreover, excellent reproducibility of the voltammetric measurements and selectivity against other hormones was found. The immunosensor was successfully applied to the analysis of human serum and urine at the clinically relevant concentration levels.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Sensors & Actuators B. 195 (2014) 494 - 499





Cite this: *Analyst*, 2014, 139, 4556

Multiplexed determination of human growth hormone and prolactin at a label free electrochemical immunosensor using dual carbon nanotube–screen printed electrodes modified with gold and PEDOT nanoparticles

V. Serafin, G. Martínez-García, L. Agúí, P. Yáñez-Sedeño* and J. M. Pingarrón

A label-free dual electrochemical immunosensor was constructed for the multiplexed determination of human growth (hGH) and prolactin (PRL) hormones. The immunosensor used an electrochemical platform composed of carbon nanotube–screen printed carbon electrodes (CNT/SPCEs) modified with poly(ethylene-dioxythiophene) (PEDOT) and gold nanoparticles, on which the corresponding hGH and PRL antibodies were immobilized. The affinity reactions were monitored by measuring the decrease in the differential pulse voltammetric oxidation response of the redox probe dopamine. The experimental variables involved in the preparation of both AuNP/PEDOT/CNT/SPC modified electrodes and the dual immunosensor were optimized. The immunosensor exhibited an improved analytical performance for hGH and PRL with respect to other electrochemical immunosensor designs, showing wide ranges of linearity and low detection limits of 4.4 and 0.22 pg mL^{-1} , respectively. An excellent selectivity against other hormones and in the presence of ascorbic and uric acids was found. The usefulness of the dual immunosensor for the simultaneous analysis of hGH and PRL was demonstrated by analyzing human serum and saliva samples spiked with the hormones at different concentration levels.

Received 29th January 2014
Accepted 10th June 2014

DOI: 10.1039/c4an00221k

www.rsc.org/analyst

***Analyst*, 139 (2014) 4556 - 4563**



9

Abreviaturas y Símbolos

A

AA	Ácido ascórbico
AAPh	Ácido 4-amino fenil acético
ACTH	Adrenocorticotropina humana
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
AlcOx	Alcohol oxidasa
Amp.	Amperometría
Anti-IGF	Anticuerpo monoclonal IGF-1
Anti-PRL	Anticuerpo monoclonal PRL
AP	Fosfatasa alcalina
AP-anti-IgG	Anticuerpo monoclonal IgG marcado con AP
AP-anti-PRL	Anticuerpo monoclonal PRL marcado con AP
4-APP	4-aminofenilfosfato
AT	Alta temperatura
AU	Ácido úrico
AuNPs	Nanopartículas de oro

B

[bmim][BF ₄]	Tetrafluoroborato 1-butil-3-imidazonio
BMIMPF ₆	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazonio
BSA	Albúmina de suero bovino
BT	Baja temperatura



CA	Creatinina amidohidrolasa
CI	Creatina amidinohidrolasa
CNTs	Nanotubos de carbono
CPEs	Electrodo de pasta de carbono convencional
CV	Voltamperometría cíclica



DA	Dopamina
DAD	Detector de series de diodos
DPV	Voltamperometría diferencial de Impulsos



EDC	N-(3-dimetilaminopropil)- N'-etilcarbodiimida
EDOT	3,4-etilendioxitiofeno
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay



Fc	Ferroceno
FHS	Hormona foliculo estimulante
FRET	Transferencia de energía de fluorescencia de resonancia

G

GCE	Electrodo de carbono vitrificado
Ghr	Grelina
Gly	Glicina
GCE	Electrodo de carbono vitrificado
Gly	Glicina
GOx	Glucosa oxidasa
GPPD	Nanopartículas de oro modificadas con poli(o-fenilendiamina)

H

hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
hFSH	Hormona estimulante del folículo (humana)
hGH	Hormona del crecimiento (humana)
hGH-m	Anticuerpo monoclonal hGH
HRP	Peroxidasa
HRP-anti-IGF	Anticuerpo monoclonal de IGF-1 marcado con HRP
HSCCC	Cromatografía en contracorriente de alta velocidad
3 α -HSD	3 α -hidroxiesteroideshidrogenasa
5-HT	Serotonina
hTSH	Hormona estimulante del tiroides

I

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico-1
I.L.	Intervalo lineal
ILs	Líquidos iónicos

K

K_M^{App}	Constante de Michaelis aparente
-------------	---------------------------------

L

LEP	Leptina
LOD	Límite de detección

M

MBs	Micropartículas magnéticas funcionalizadas
MECC	Cromatografía micelar electrocinética capilar
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética
MBs	Micropartículas magnéticas funcionalizadas
MECC	Cromatografía micelar electrocinética capilar
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética
MET	Metionina
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
MYR	Mirosinasa



NHS	N-hidroxisuccinimida
1-NP	1-Naftol
NPG	Oro nanoporoso
1-NPP	1-Naftilfosfato



OPPF ₆	Hexafluorofosfato de octadecilpiridinio
-------------------	---



P	Progesterona
p-anti-hGH	Anticuerpo policlonal hGH
PB	Azul de Prusia
Pd-PEDOTn	Nanofibras de polímero y nanopartículas de Pd
PEDOT	poli(3,4-etilendioxitiofeno)
PPA	Ácido pirrolpropiónico
pPPA	Ácido poli(pirrol-propiónico)
pPy	Polipirrol
PRL	Prolactina
PSS	Poli(ácido estireno sulfónico)

R

RSD	Desviación estándar relativa
RTILs	Líquidos iónicos a temperatura ambiente

S

S _b	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SO	Sarcosina oxidasa
SPAuE	Electrodo de oro serigrafiado
SPCE	Electrodo de carbono serigrafiado
SPE	Extracción en fase sólida
SPR	Resonancia de plasmón superficial
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada

T

TCNQ	Tetracianoquinodimetano
Teflón	Poli(tetrafluoroetileno)
Test	Testosterona
TRH	Hormona liberadora de la tirotrópina
Ts-MB	Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo
TTF	Tetratiafulvaleno
Tyr	Tirosinasa

 V_{MAX}

Velocidad máxima

VIP

Polipéptido vasoactivo intestinal



WADA

Agencia Mundial Antidopaje (AMA)