

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Analítica



## TESIS DOCTORAL

### **Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene Ojeda Fernández**

Directores

Araceli González Cortés  
Paloma Yáñez-Sedeño Orive  
José Manuel Pingarrón Carrazón

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Analítica



# Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad

Directores:

**Dra. Araceli González Cortés**  
Profesora Titular de la UCM

**Dra. Paloma Yáñez-Sedeño Orive**  
Catedrática de la UCM

**Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón**  
Catedrático de la UCM

**Tesis Doctoral**  
**Irene Ojeda Fernández**  
**Madrid, 2015**



# ÍNDICE





---

---

1. SUMMARY.....	1
1.1. Introduction .....	3
1.2. Aims of this work .....	3
1.3. Research results .....	4
1.3.1. Magnetoimmunosensors .....	4
1.3.3. Electrochemical grafting.....	5
1.3.3. Carbon nanomaterials .....	5
1.4. Milestones.....	6
2. RESUMEN.....	7
2.1. Introducción .....	9
2.2. Objetivos .....	9
2.3. Resultados.....	10
1.3.1. Magnetoimmunosensores.....	10
1.3.3. Grafting electroquímico .....	11
1.3.3. Nanomateriales de carbono.....	11
2.4. Conclusiones .....	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
3.1. Objetivo y plan de trabajo.....	15
3.2. Obesidad y marcadores de la obesidad .....	16
3.2.1. Proteínas de fase aguda .....	18
3.2.1.1. Ceruloplasmina .....	19
3.2.1.2. Fibrinógeno.....	20
3.2.2. Adipoquinas.....	21
3.2.2.1. Leptina .....	21
3.2.2.2. Interleucina 6.....	23
3.2.2.3. Adiponectina.....	25
3.2.3. Hormonas esteroideas .....	26
3.2.3.1. Estradiol .....	27

3.3. Inmunoensayos e inmunosensores.....	29
3.3.1. Tipos de inmunoensayos .....	31
3.3.2. Inmunosensores electroquímicos .....	32
3.3.2.1. Inmunosensores desarrollados .....	33
3.4. Empleo de micropartículas magnéticas para el desarrollo de inmunosensores .....	34
3.5. Desarrollo de inmunosensores basados en la modificación de la superficie electródica .....	40
3.5.1. <i>Grafting</i> electroquímico .....	40
3.5.2. Nanomateriales empleados para la modificación de la superficie electródica .....	46
3.5.2.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs).....	47
3.5.2.3. Nanotubos de carbono de pared doble (DWCNTs).....	51
3.5.2.2. Nanocuernos de carbono (CNHs) .....	52
3.6. Estrategias empleadas para la inmovilización de biomoléculas .....	55
3.6.1. Uniones de afinidad.....	55
3.6.1.1. Biotina-(estrept)avidina.....	56
3.6.1.2. Proteína A-anticuerpo .....	57
3.6.2. Unión covalente.....	59
3.6.3. Unión mediante complejos metálicos.....	60
3.7. Revisión bibliográfica de métodos de determinación de las proteínas marcadoras de la obesidad .....	62
3.7.1. Leptina .....	62
3.7.2. Interleucina 6.....	66
3.7.4. Adiponectina.....	72
3.7.3. Ceruloplasmina .....	76
3.7.5. Fibrinógeno.....	79
3.7.6. Estradiol .....	87

---

4. PARTE EXPERIMENTAL.....	95
4.1. Instrumentación .....	97
4.1.1. Aparatos.....	97
4.1.2. Electrodo.....	98
4.2. Reactivos .....	99
4.3. Disoluciones.....	102
4.4. Muestras.....	104
4.5. Procedimientos experimentales .....	105
4.5.1. Preparación de los inmunosensores basados en micropartículas magnéticas.....	105
4.5.1.1. Magnetoinmuno sensor para la determinación de leptina .....	105
4.5.1.2. Magnetoinmuno sensor para la determinación de interleucina 6 .....	106
4.5.1.3. Magnetoinmunosensores para la determinación de ceruloplasmina .....	107
4.5.2. Preparación del inmunosensor basado en <i>grafting</i> sobre un electrodo serigrafiado de carbono.....	109
4.5.2.1. Inmunosensor para la determinación de estradiol .....	109
4.5.3. Preparación de inmunosensores basados en electrodos modificados con nanomateriales de carbono.....	110
4.5.3.1. Inmunosensor para la determinación de ceruloplasmina .....	110
4.5.3.2. Inmunosensor para la determinación de adiponectina .....	111
4.5.3.3. Inmunosensor para la determinación de fibrinógeno .....	112
4.6. Análisis de muestras .....	112
4.6.1. Determinación de leptina en suero humano, leche en polvo y leche materna con el magnetoinmuno sensor AP-anti-IgG/anti-Lep /Lep/ /anti-Lep-biotin/Strept-MBs.....	112

4.6.2. Determinación de interleucina 6 en orina y saliva con el magnetoinmunosensor Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/ /anti-IL-6/HOOC-MBs .....	114
4.6.3. Determinación de ceruloplasmina en suero empleando el magnetoinmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs. ....	114
4.6.4. Determinación de estradiol en suero y orina con el inmunosensor HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE.....	115
4.6.5. Determinación de ceruloplasmina en suero y orina empleando el inmunosensor HRP-anti-IgGP/anti-Cp/Cp/MWCNT-SPCE.....	115
4.6.6. Determinación de adiponectina en suero con el inmunosensor HRP-Strep/biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE.....	116
4.6.7. Determinación de fibrinógeno en plasma y orina con el inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE .....	116
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>5.1. Inmunosensores electroquímicos basados en micropartículas magnéticas funcionalizadas.....</b>	<b>121</b>
5.1.1. Magnetoinmunosensor para leptina.....	123
5.1.1.1. Configuración del magnetoinmunosensor.....	124
5.1.1.2. Optimización de las variables experimentales.....	125
5.1.1.3. Calibrado y características analíticas.....	130
5.1.1.4. Estudios de reactividad cruzada.....	132
5.1.1.5. Aplicación a la determinación de leptina en suero, en leche en polvo para lactantes y en leche materna .....	134
5.1.1.6. Conclusiones.....	137
5.1.2. Magnetoinmunosensor para interleucina 6.....	139
5.1.2.1. Configuración del magnetoinmunosensor.....	140
5.1.2.2. Optimización de las variables experimentales del magnetoinmunosensor preparado con HRP-Strept .....	141
5.1.2.3. Optimización de las variables experimentales del magnetoinmunosensor preparado con Poli-HRP-Strept .....	144

---

5.1.2.4. Curvas de calibrado y características analíticas .....	149
5.1.2.5. Selectividad del magnetoinmunosensor .....	153
5.1.2.6. Aplicación del magnetoinmunosensor Poli-HRP-Strep/ /biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs a la determinación de interleucina 6 en orina y saliva .....	153
5.1.2.7. Conclusiones.....	156
5.1.3. Magnetoinmunosensores para ceruloplasmina.....	159
5.1.3.1. Configuración de los magnetoinmunosensores.....	160
5.1.3.2. Optimizaciones de las variables experimentales del magneto- inmunosensor preparado con Prot A-MBs.....	161
5.1.3.3. Optimizaciones de las variables experimentales del magneto- inmunosensor preparado con Strept-MBs.....	166
5.1.3.4. Calibrado y características analíticas.....	172
5.1.3.5. Selectividad de los magnetoinmunosensores.....	177
5.1.3.6. Aplicación del magnetoinmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/ Strept-MBs/SPCE a la determinación de ceruloplasmina en una muestra de suero enriquecida .....	180
5.1.3.7. Conclusiones .....	182
<b>5.2. Inmunosensor electroquímico basado en la modificación de la superficie electródica por <i>grafting</i> .....</b>	<b>183</b>
5.2.1. Inmunosensor para estradiol .....	185
5.2.1.1. Configuración del inmunosensor .....	186
5.2.1.2. Caracterización de la superficie electródica.....	187
5.2.1.3. Optimización de las variables experimentales.....	188
5.2.1.4. Curvas de calibrado y características analíticas .....	193
5.2.1.5. Selectividad del inmunosensor .....	197
5.2.1.6. Aplicación a la determinación de estradiol en suero y orina.....	199
5.2.1.7. Conclusiones.....	201
<b>5.3. Inmunosensores electroquímicos basados en la modificación de la superficie electródica con nanomateriales de carbono .....</b>	<b>203</b>

5.3.1. Inmunosensor para ceruloplasmina empleando nanotubos de carbono de pared múltiple .....	205
5.3.1.1. Configuración del inmunosensor .....	206
5.3.1.2. Optimización de las variables experimentales.....	207
5.3.1.3. Calibrado y características analíticas.....	213
5.3.1.4. Selectividad del inmunosensor .....	215
5.3.1.5. Aplicación a la determinación de ceruloplasmina en una muestras de suero y orina enriquecidas .....	216
5.3.1.6. Conclusiones.....	220
5.3.2. Inmunosensor para adiponectina empleando nanotubos de carbono de pared doble .....	223
5.3.2.1. Configuración del inmunosensor .....	224
5.3.2.2. Caracterización de los nanotubos de pared doble (DWCNT).....	225
5.3.2.3. Optimización de las variables experimentales.....	227
5.3.2.4. Curva de calibrado y características analíticas.....	234
5.3.2.5. Respuesta comparativa del inmunosensor sobre electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT/SPCE) y con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs/SPCE) .....	236
5.3.2.6. Selectividad del inmunosensor .....	237
5.3.2.7. Aplicación a la determinación de adiponectina en suero .....	238
5.3.2.8. Conclusiones.....	239
5.3.3. Inmunosensor para fibrinógeno empleando nanocuernos de carbono.....	241
5.3.3.1. Configuración del inmunosensor .....	242
5.3.3.2. Caracterización de CNHs y Fib-CNHs.....	242
5.3.3.3. Optimización de las variables experimentales.....	244
5.3.3.4. Curva de calibrado y características analíticas.....	252
5.3.3.5. Respuesta comparativa del inmunosensor sobre electrodos modificados con nanocuernos de carbono (CNHs/SPCE) y con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs/SPCE) .....	255

5.3.3.6. Selectividad del inmunosensor .....	256
5.3.3.7. Aplicación a la determinación de fibrinógeno en plasma y orina.....	257
5.3.3.8. Conclusiones.....	259
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>261</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>265</b>
<b>8. GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>289</b>
<b>9. PUBLICACIONES .....</b>	<b>293</b>



# 1. SUMMARY

1.1. Introduction

1.2. Aims of this work

1.3. Research results

1.4. Milestones



# Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad

## 1.1. INTRODUCTION

### *Obesity biomarkers*

Nowadays obesity is recognized as a worldwide epidemic with exponentially increasing incidence. The pathology of obesity is associated with numerous comorbidities such as hypertension, dyslipidemia, diabetes and subsequent cardiovascular diseases (CVDs). Since morbid obesity is characterized by a chronic inflammatory state, an array of inflammatory biomarkers result chronically dysregulated as a result of the altered endocrine function of adipocytes. In this context, most adipokines with pro-inflammatory properties are overproduced with increasing adiposity (for example, leptin and interleukin 6), whereas some adipokines with anti-inflammatory or insulin-sensitizing properties, like adiponectin, are typically decreased. Several studies have also reported the positive correlations of body fat mass or weight gains with inflammation sensitive plasma proteins (ISPs) including ceruloplasmin and fibrinogen. Regarding the relationship between obesity and estradiol, it has been observed that people with severe obesity have an increased estrogen production, with increase in the plasma concentration of estradiol and estrone.

## 1.2. AIM OF THIS WORK

The aim of this work was the design and development of novel electrochemical platforms able to allow the sensitive, reliable and selective determination of different proteins considered as important biomarkers of obesity and related diseases.

As it will be described, different electrochemical immunosensors involving the use of functionalized magnetic beads (MBs) and nanocarbon materials have been implemented for the achievement of this goal. Moreover, the developed immunosensors have been applied to the analysis of the target biomarkers in real samples such as milk, serum, plasma, urine and saliva.

## 1.3. RESEARCH RESULTS

### 1.3.1. Magnetoimmunosensors

#### *Magnetoimmunosensor for leptin*

The approach involved immobilization of a specific biotinylated anti-leptin antibody on the surface of streptavidin-functionalized MBs and a sandwich-type immunoassay. A calibration plot with a linear range between 5 and 100pg/mL as well as a detection limit of 0.5pg/mL were achieved. The usefulness of the immunosensor was demonstrated by analyzing different types of real samples: human serum, infant powdered milk, and breast milk from two nursing mothers with two months of breastfeeding.

#### *Magnetoimmunosensor for interleukin 6*

A novel magnetoimmunosensor design for interleukin-6 (IL-6) using a sandwich-type immunoassay with signal amplification using poly-HRP-streptavidin conjugates was developed. A linear calibration plot between the measured steady-state current and the log of IL-6 concentration was achieved in the 1.75 to 500pg/mL range, which was not feasible when using conventional HRP-streptavidin as label. A limit of detection of 0.39pg/mL was obtained. The immunosensor was used to determine IL-6 in urine samples spiked at three different concentration levels with clinical relevance. Moreover, IL-6 was measured in three saliva samples corresponding to a periodontitis patient, a smoker volunteer, and a non-smoker volunteer.

#### *Magnetoimmunosensors for ceruloplasmin*

Two configurations involving MBs functionalized with Protein A (Prot A) or Streptavidin (Strept) for immobilization of ceruloplasmin (Cp) antibodies were compared, using competitive immunoassays. The linear ranges of the corresponding calibration curves and the detection limits were 0.1–1000 $\mu$ g/mL and 0.040 $\mu$ g/mL (Prot A-MBs), and 0.025–20 $\mu$ g/mL and 0.018 $\mu$ g/mL (Strept-MBs), respectively. Good results were obtained for the determination of Cp in spiked human serum samples.

### 1.3.2. Electrochemical grafting

#### *Immunosensor for estradiol*

This work describes the preparation of an electrochemical immunosensor for estradiol involving surface modification of screen printed carbon electrodes with grafted *p*-aminobenzoic acid. The hormone determination was performed by means of a competitive immunoassay. The calibration curve for estradiol exhibited a linear range between 1 and 250pg/mL and a detection limit of 0.77pg/mL. The developed immunosensor was applied to the analysis of certified serum and spiked urine samples.

### 1.3.3. Carbon nanomaterials

#### *Immunosensor for ceruloplasmin*

A novel electrochemical immunosensor for the determination of ceruloplasmin in human serum and urine was developed. The immunosensor configuration involves an indirect competitive immunoassay implying covalent immobilization of Cp on activated carboxylic groups at carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes (MWCNT-SPCE). Calibration curves for Cp provided a linear range between 0.07 and 250µg/mL. The limit of detection was 21ng/mL.

#### *Immunosensor for adiponectin*

An electrochemical immunosensor for adiponectin (APN) using screen printed carbon electrodes modified with functionalized double-walled carbon nanotubes (DWCNT-SPCE) as platforms for immobilization of the specific antibodies was developed. The oriented binding of specific antibodies toward APN was accomplished by using the metallic-complex chelating polymer Mix&Go™. Calibration plot for APN was constructed showing a range of linearity extending between 0.05 and 10.0µg/mL and a detection limit of 14.5ng/mL. The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing serum from healthy patients.

#### *Immunosensor for fibrinogen*

This work describes a novel electrochemical immunosensor design making use of carbon nanohorns (CNHs) as a scaffold for the preparation of disposable immunosensing platforms for the determination of fibrinogen (Fib). The Fib determination was performed by

means of indirect competitive immunoassay. The calibration plot for Fib allowed a range of linearity between 0.1 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  and a detection limit of 58 $\text{ng}/\text{mL}$  to be achieved. This simple and relatively low cost immunosensor configuration permitted the sensitive and selective determination of Fib in plasma and urine.

### 1.4. MILESTONES

The main milestones of the research work contained in this PhD Thesis are:

- The design and development of a voltamperometric magnetoimmunosensor for the determination of leptin in human milk and serum samples.
- The design and development of a magnetoimmunosensor for the determination of interleukin 6 in saliva and urine samples.
- The development of a magnetoimmunosensor based on a competitive assay configuration for the determination of ceruloplasmin in serum samples.
- The design and development of an immunosensor employing the technique of electrochemical grafting for the determination of estradiol in urine and serum samples.
- The development of an immunosensor employing multi-walled carbon nanotubes and based on an indirect competitive assay configuration for the determination of ceruloplasmin in serum and urine samples.
- The use of a double-walled carbon nanotubes-based electrochemical platform for the construction of an adiponectin immunosensor and its determination in serum.
- The implementation of a rapid and simple methodology for the construction of a fibrinogen immunosensor involving modified carbon nanohorns electrochemical platforms for the determination of the target protein in urine and plasma.

## 2. RESUMEN

2.1. Introducción

2.2. Objetivos

2.3. Resultados

2.4. Conclusiones



---

# Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### *Marcadores de la obesidad*

Hoy en día la obesidad es considerada como una epidemia mundial con una incidencia creciente exponencialmente. La obesidad está asociada a numerosas comorbilidades como hipertensión, dislipidemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Durante los últimos años ha comenzado a considerarse como una patología inflamatoria crónica de bajo grado, caracterizada por una elevación los niveles plasmáticos de diversas proteínas que se producen y/o residen en el tejido adiposo, y que pueden utilizarse como biomarcadores de enfermedades relacionadas. En este contexto, la mayoría de adipoquinas con propiedades pro-inflamatorias se producen en exceso con el aumento de la adiposidad (por ejemplo, leptina e interleucina 6), mientras que algunas adipoquinas con propiedades anti-inflamatorias o sensibilizantes a la insulina, como la adiponectina, disminuyen. Varios estudios informan de la correlación positiva del aumento de grasa corporal con proteínas plasmáticas sensibles a la inflamación (ISP), incluyendo la ceruloplasmina y el fibrinógeno. Respecto a la relación entre la obesidad y estradiol, se ha observado que las personas con obesidad severa tienen un aumento de la producción de estrógenos, con aumento en la concentración plasmática de estradiol y estrona.

## 2.2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue el diseño y desarrollo de nuevas plataformas electroquímicas capaces de permitir la determinación sensible, fiable y selectiva de diferentes proteínas consideradas como biomarcadores de la obesidad y enfermedades relacionadas.

Para lograr este objetivo se han desarrollado diferentes inmunosensores electroquímicos basados en el uso de partículas magnéticas (MBs) funcionalizadas y nanomateriales de carbono. Por otra parte, los inmunosensores desarrollados se han

aplicado al análisis de dichos biomarcadores en muestras de leche, suero, plasma, orina y saliva.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Magnetoinmunosensores

#### ***Magnetoinmunosensor para leptina***

El inmunosensor implica la inmovilización de un anticuerpo específico anti-leptina biotinilado en la superficie de las MBs funcionalizadas con estreptavidina y un inmunoensayo tipo sándwich, obteniéndose una curva de calibrado con un intervalo lineal entre 5 y 100pg/mL y un límite de detección de 0.5pg/mL. Su utilidad se demostró mediante el análisis de muestras de suero, leche en polvo para lactantes y leche materna de dos madres lactantes con dos meses de lactancia materna.

#### ***Magnetoinmunosensor para interleucina 6***

Se ha diseñado un novedoso magnetoinmunosensor para interleucina-6 de tipo sándwich con amplificación de la señal usando un polímero de HRP-estreptavidina. Se ha obtenido una curva de calibrado con un intervalo lineal entre 1.75 y 500pg/mL, mejorando al obtenido empleando HRP-estreptavidina, y un límite de detección de 0.39pg/mL. El magnetoinmunosensor fue aplicado al análisis de muestras de orina enriquecida y muestras de saliva de un paciente con periodontitis, un voluntario fumador y uno no fumador.

#### ***Magnetoinmunosensores para ceruloplasmina***

Se han desarrollado y comparado dos configuraciones basadas en MBs funcionalizadas con proteína A (Prot A) o estreptavidina (Strept) para la inmovilización de los anticuerpos, usando un inmunoensayo competitivo directo. Los intervalos lineales y los límites de detección de ceruloplasmina fueron 0.1–1000µg/mL y 0.040µg/mL (Prot A-MBs), y 0.025–20µg/mL y 0.018µg/mL (Strept-MBs), respectivamente. Se obtuvieron buenos resultados en el análisis de muestras de suero enriquecidas.

### 2.3.2. *Grafting* electroquímico

#### *Inmunosensor para estradiol*

Este trabajo describe la preparación de un inmunosensor competitivo directo para estradiol basado en la modificación electródica mediante *grafting* electroquímico con ácido *p*-aminobenzoico. Se obtuvo un intervalo lineal entre 1 y 250pg/mL y un límite de detección de 0.77pg/mL. El inmunosensor fue aplicado al análisis de un suero certificado y orina enriquecida.

### 2.3.3. Nanomateriales de carbono

#### *Inmunosensor para ceruloplasmina*

Se ha desarrollado un novedoso inmunosensor para la determinación de ceruloplasmina en suero y orina. El inmunoensayo competitivo indirecto implica la inmovilización covalente de Cp sobre los grupos carboxílicos activados de los nanotubos de carbono de pared múltiple sobre los electrodos de carbono serigrafiados. Se obtuvo un intervalo lineal entre 0.07 y 250µg/mL y un límite de detección de 21ng/mL.

#### *Inmunosensor para adiponectina*

Se ha desarrollado un inmunosensor para adiponectina usando electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT-SPCE) como plataforma de inmovilización orientada del anticuerpo de captura mediante el polímero metálico Mix&Go. La curva de calibrado muestra un intervalo lineal entre 0.05 y 10.0µg/mL y un límite de detección de 14.5ng/mL. El inmunosensor se aplicó al análisis de suero de pacientes sanos.

#### *Inmunosensor para fibrinogeno*

Este trabajo describe el diseño de un novedoso inmunosensor basado en el empleo de nanocuernos de carbono como plataforma para la determinación de fibrinógeno (Fib). La determinación de fibrinógeno se realiza mediante un inmunoensayo de tipo competitivo indirecto. La curva de calibrado presenta un intervalo lineal entre 0.1 y 100 µg/mL y un límite de detección de 58 ng/mL. Este simple y relativamente barato inmunosensor permite la determinación de Fib de forma sensible y selectiva en muestras de plasma y orina.

## 2.4. CONCLUSIONES

Los principales logros de la investigación contenida en esta tesis doctoral son:

- El diseño y desarrollo de un magnetoinmuno sensor voltamperométrico para la determinación de leptina en muestras de leche y suero humano.
- El diseño y desarrollo de un magnetoinmuno sensor para la determinación de interleucina 6 en muestras de saliva y orina.
- El desarrollo de un magnetoinmuno sensor basado en una configuración de ensayo competitivo para la determinación de ceruloplasmina en muestras de suero.
- El diseño y desarrollo de un inmuno sensor empleando la técnica de *grafting* electroquímico para la determinación de estradiol en muestras de orina y suero humano.
- El desarrollo de un inmuno sensor empleando nanotubos de carbono y basado en una configuración de ensayo competitivo indirecto para la determinación de ceruloplasmina en muestras de suero y orina de carbono de pared múltiple.
- El uso de una plataforma electroquímica basada en nanotubos de carbono de pared doble para la construcción de un inmuno sensor para adiponectina y su determinación en suero.
- La aplicación de una metodología rápida y simple para la construcción de un inmuno sensor para fibrinógeno que implica la modificación de la superficie eléctrica con nanocuernos de carbono para la determinación de la proteína diana en la orina y plasma.

## 3. INTRODUCCIÓN

3.1. Objetivo y plan de trabajo

3.2. Obesidad y marcadores de la obesidad

3.3. Inmunoensayos e inmunosensores

3.4. Empleo de micropartículas magnéticas para el desarrollo de inmunosensores

3.5. Nanomateriales empleados para la modificación de la superficie electródica

3.6. Estrategias empleadas para la inmovilización de biomoléculas

3.6. Métodos de determinación de los analitos estudiados



### 3.1. OBJETIVO 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.

El objetivo general de las investigaciones ha sido el diseño y desarrollo de inmunosensores electroquímicos novedosos para la determinación de marcadores de obesidad y enfermedades relacionadas. Para ello se ha considerado el empleo de plataformas electródicas originales, modificadas con micro- y nanomateriales de última generación, adecuadas para la inmovilización estable y eficaz de biomoléculas, y capaces de proporcionar respuestas electroquímicas sensibles y reproducibles en relación al inmunoensayo que se pretende monitorizar. Por otro lado, se han seleccionado varias moléculas de interés biológico e importancia demostrada en el ámbito de estas patologías, con el fin de aplicar las superficies desarrolladas a su determinación en muestras clínicas. Como se verá más adelante, entre los materiales utilizados para la preparación de las superficies electródicas destacan las micropartículas magnéticas funcionalizadas y los nanomateriales de carbono: nanotubos de pared múltiple (MWCNTs) o doble (DWCNTs), y nanocuernos (CNHs). En cuanto a las biomoléculas, se han estudiado especies de distinta naturaleza: proteínas sensibles a la inflamación (ISPs) como la ceruloplasmina o el fibrinógeno, adipoquinas como la leptina, la interleucina 6 o la adiponectina, y el estradiol, como representante del grupo de las hormonas esteroideas.

La relevancia del objetivo planteado radica principalmente en el interés creciente de los analitos propuestos, para los que no se han desarrollado todavía inmunosensores adecuados (o su número es muy escaso), y cuya determinación se realiza actualmente mediante técnicas de inmunoensayo tipo ELISA que adolecen de falta de sensibilidad y requieren un elevado consumo de tiempo y de muestra. Frente a esta metodología, los inmunosensores ofrecen ventajas considerables, como son su mayor sensibilidad, rapidez, precisión y menor consumo de inmunorreactivos.

Los objetivos concretos planteados en esta Tesis están incluidos en los Proyectos de Investigación mantenidos por el Grupo durante el tiempo de realización del trabajo experimental, en particular en los Proyectos de referencia CTQ2009-12650

del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y CTQ2012-35041 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). En ellos se expresaba el interés por el desarrollo de plataformas sensoras basadas en nanomateriales biocompatibles, así como de nuevas estrategias de preparación de inmunosensores electroquímicos para la detección de marcadores de la obesidad y su aplicación al análisis de muestras biológicas.

El plan de trabajo seguido para alcanzar estos objetivos consta de varias etapas, entre las cuales hay algunas comunes al desarrollo de las diferentes configuraciones descritas en esta Tesis Doctoral, y que son las siguientes:

- Diseño del inmunosensor y de la estrategia de inmunoensayo.
- Optimización de las condiciones experimentales de preparación y detección electroquímica.
- Establecimiento de calibrados y características analíticas de los inmunosensores desarrollados.
- Estudios de selectividad.
- Aplicación a muestras.

### **3.2. OBESIDAD Y MARCADORES DE LA OBESIDAD**

La obesidad es un serio problema de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en muchos países desarrollados. Actualmente afecta a más de 600 millones de personas, un 13% de la población mundial, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de enero de 2014 [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>]. Como es sabido, este estado se caracteriza médicamente por la medida de un índice de masa corporal (BMI) superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, y se tiene evidencia de su relación con otras enfermedades, muchas veces agrupadas bajo la denominación común de "síndrome metabólico", que abarca desde trastornos en el sueño al riesgo incrementado de sufrir accidentes cardiovasculares, pasando por la diabetes y algunas enfermedades inflamatorias crónicas [Engstrom, 2003]. Hasta hace poco tiempo, la obesidad se consideraba de un modo muy simple como el resultado de un balance energético inadecuado: mayor consumo en forma de

alimentos y menor gasto en forma de ejercicio. Sin embargo, actualmente se sabe que este estado es consecuencia de muchos y diversos procesos patogénicos, cada uno de ellos complejo en sus características, y de origen multifactorial **[Engstrom, 2003]**.

Una clave importante para llegar a este conocimiento ha sido la investigación exhaustiva realizada en estos últimos años sobre el tejido adiposo. Se pensaba que este tejido era un mero reservorio energético, pero se ha podido demostrar que en realidad actúa como un órgano endocrino multifuncional segregando un buen número de moléculas bioactivas que desempeñan papeles relevantes en el organismo. Así, entre estas sustancias se incluyen algunas citoquinas, varias hormonas y factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, prostaglandinas, glucocorticoides y esteroides. En la obesidad, las alteraciones en las concentraciones de algunas de estas sustancias contribuyen a crear un estado inflamatorio de nivel bajo pero que afecta al desarrollo posterior de enfermedades como la hipertensión arterial, asma, artritis, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o resistencia a la insulina, conduciendo a procesos más graves como son algunas patologías del síndrome metabólico antes señaladas, o ciertos tipos de cáncer **[Greenberg, 2006]**. Debido a sus propiedades, algunas de estas sustancias se han propuesto como biomarcadores de la obesidad y de enfermedades relacionadas **[Moreno, 2000]**.

Los adipocitos, células implicadas en estos procesos, se han revelado como un componente crítico del control metabólico y endocrino del organismo. Sin embargo, todavía queda mucho por conocer de su modo de acción y, en el ámbito concreto de la obesidad, de cómo están relacionados con el desarrollo de los procesos inflamatorios y cuáles son las moléculas que actúan como mediadoras en dichos procesos. En las personas delgadas se ha visto que los adipocitos liberan hormonas que modulan la grasa corporal. Sin embargo, en las situaciones de sobrepeso, los adipocitos se agrandan y estos mecanismos de control dejan de ser regulares. Además, se produce una notable acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, en un número proporcional al índice de masa corporal **[Weisberg, 2003]**. Aunque no se sabe exactamente qué determina la llegada de macrófagos circulantes (monocitos) al tejido adiposo, una de las hipótesis más aceptadas señala a la muerte adipocitaria causada por un déficit de irrigación sanguínea (hipoxia) como motivo principal. Estas células, cuyo papel preponderante es la eliminación de los adipocitos moribundos, son

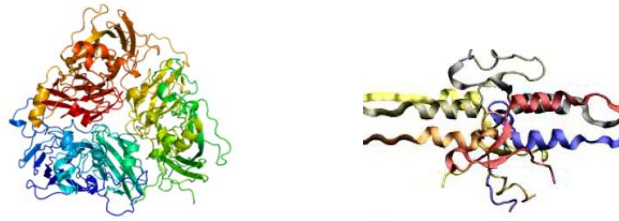
también los principales responsables de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo obeso. Una de las citoquinas generadas durante este proceso es la interleucina 6 (IL-6), cuya concentración plasmática se ve notablemente incrementada en la obesidad, y que ha sido postulada como una de las proteínas implicadas en la generación de resistencia a la insulina.

Como es bien conocido, la inflamación surge, de un modo general, como una respuesta fisiológica del organismo tendente a recuperar el equilibrio (homeostasis) ante una alteración de origen externo. Durante ella se suceden diversos procesos, como es la secreción de proteínas anti-inflamatorias, la inhibición de cascadas de proteínas pro-inflamatorias y la activación de células reguladoras. Entre otras muchas sustancias, en los individuos obesos se han observado elevados niveles de leucocitos en sangre, así como presencia de citoquinas pro-inflamatorias como la ya citada IL-6 y otras proteínas sensibles a la inflamación (ISPs) como la ceruloplasmina o el fibrinógeno (proteínas de fase aguda). También se encuentran concentraciones elevadas de adipoquinas como la leptina, niveles disminuídos de adipoquinas anti-inflamatorias como la adiponectina, y alteraciones en los niveles de hormonas esteroideas.

En este trabajo se han desarrollado inmunosensores electroquímicos para la determinación de algunas biomoléculas que desempeñan papeles relevantes en estos procesos. Con el fin de describir de un modo sistemático sus características, éstas se han organizado en tres grupos: proteínas de fase aguda, adipoquinas y hormonas esteroideas, habiéndose resaltado esencialmente su importancia en relación a la obesidad, los niveles fisiológicos normales y las causas de su alteración.

### **3.2.1. Proteínas de fase aguda**

Una proteína de fase aguda es aquélla cuya concentración plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positivas) o disminuye (proteínas de fase aguda negativas) al menos un 25% durante los procesos inflamatorios [Gabay, 1999]. La ceruloplasmina y el fibrinógeno, cuyas estructuras se han representado en la Figura 1, son proteínas sensibles a la inflamación (ISPs) pertenecientes a este grupo, cuyos niveles se han visto asociados a factores de riesgo cardiovascular y al aumento del peso corporal.



**Figura 1.** Estructuras de la ceruloplasmina y el fibrinógeno.

### 3.2.1.1. Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) es una  $\alpha$ 2-glicoproteína que transporta el 90% del cobre en el plasma. Pertenece a la familia de las multicuprooxidasas ya que contiene seis átomos de cobre en su estructura. El interés que presenta su determinación se debe, no solo al aumento de sus niveles en procesos inflamatorios y traumáticos, sino también a otras funciones fisiológicas. Durante su síntesis en los hepatocitos, la proteína incorpora cobre a su estructura y tras secretarse del hígado, migra a los tejidos que requieren este elemento, para descomponerse liberándolo. En circulación, la Cp se encuentra en dos formas, apoceruloplasmina y holoceruloplasmina, que corresponden, respectivamente, a las de la proteína sin y con actividad enzimática. La Cp en el plasma muestra una actividad oxidasa dependiente del cobre, probablemente asociada a la oxidación de ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), lo que facilita su incorporación a la transferrina, que solo puede transportar este último ion [Osaki, 1996]. Al igual que en el caso de otras proteínas, las concentraciones de Cp en plasma disminuyen en pacientes con problemas hepáticos, debido a que se reduce su capacidad para sintetizarla.

Los niveles normales de ceruloplasmina en sangre se encuentran en el intervalo de 18 a 131  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los recién nacidos, de 210 a 440  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en mujeres, y de 180 a 410  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en hombres [Miale, 1977]. Desde hace tiempo se sabe que los pacientes con obesidad central presentan concentraciones elevadas de ceruloplasmina en suero, pudiendo correlacionarse estos niveles con valores altos de triglicéridos, hipercolesterolemia, y acumulación de grasa [Cignarelli, 1996], así como con la diabetes [Kim, 2002]. En la actualidad se siguen elaborando estudios que relacionan las concentraciones séricas de ceruloplasmina con el riesgo de padecer trastornos cardiovasculares en pacientes que presentan sobrepeso u obesidad [Kim, 2011].

En relación con otras enfermedades, se sabe que niveles de ceruloplasmina superiores a los normales aparecen también en caso de otros tipos de infecciones agudas y crónicas, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia o trastorno obsesivo-compulsivo, así como en presencia de linfomas, o en el embarazo [Larkin, 2004]. Por otro lado, los niveles de ceruloplasmina por debajo de lo normal pueden indicar enfermedad hepática crónica o una absorción intestinal deficiente, así como desnutrición, síndrome de Menkes, síndrome nefrótico, enfermedad de Wilson, o simplemente una ingesta excesiva de vitamina C [Somani, 2007; Korman, 2008].

### 3.2.1.2. Fibrinógeno

El fibrinógeno es también una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado. Posee una masa molecular de 340 kDa, y sus concentraciones normales en el plasma humano se encuentran entre 1.5 y 4.5 mg/mL [Lowe, 2004]. Esta proteína juega un papel clave en el sistema hemostático. Es un precursor de la fibrina, proteína que interviene de forma fundamental en la coagulación sanguínea. La proteólisis del fibrinógeno a monómeros de fibrina está catalizada por la trombina. Estos monómeros se unen espontáneamente formando hebras de fibrina que, a diferencia del fibrinógeno, son insolubles. Finalmente estas hebras interaccionan entre ellas formando entrecruzamientos por la acción de otra enzima, el factor XIII, que da lugar al coágulo de sangre [Hantgan, 1994].

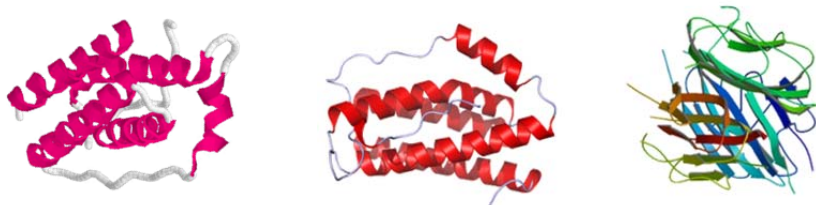
En relación a la obesidad, hay que destacar que la producción de fibrinógeno en el hígado parece estar regulada por la IL-6 [Kerr, 2001], habiéndose considerado, desde hace tiempo, que niveles clínicamente altos de dicha proteína pueden deberse a enfermedades inflamatorias [Eliasson 1993; Humphries, 1999]. Estos niveles elevados se asocian además a un mayor riesgo de accidentes cardiovasculares por aumento de la viscosidad del plasma [Lowe, 1999]. El fibrinógeno plasmático se puede utilizar como biomarcador del síndrome metabólico, correlacionándose positivamente con el índice de masa corporal, la circunferencia de la cintura, el índice cintura-cadera, y el porcentaje de grasa corporal, habiéndose observado la disminución de su concentración con la pérdida de peso [Ditschuneit, 1995].

En relación con otras enfermedades, la determinación de fibrinógeno y sus productos de degradación en orina tiene también un gran interés para la detección del síndrome nefrótico y cáncer de vejiga y de ovario.

### 3.2.2. Adipoquinas

Como se ha señalado, el tejido adiposo produce numerosas proteínas denominadas genéricamente adipoquinas (o adipocitoquinas), que poseen propiedades y actividad biológica bien diferenciadas. A través de estas sustancias el tejido adiposo no solo influye sobre la propia biología adipocitaria sino también sobre la regulación de la homeostasis energética, la sensibilidad insulínica y el metabolismo de lípidos y carbohidratos, entre otros factores [Havel, 2004].

En este trabajo se han estudiado tres proteínas, leptina, interleucina 6 y adiponectina, habitualmente consideradas adipoquinas, aunque muy diferentes entre sí, tanto en su origen como en su papel preponderante y su incidencia en y durante los procesos que tienen lugar en el estado de obesidad. A continuación se describen las propiedades de estas sustancias, cuyas estructuras se han representado en la Figura 2.



**Figura 2.** Estructuras de la leptina, la interleucina 6 y la adiponectina.

#### 3.2.2.1. Leptina

La leptina es una hormona peptídica de 16 kDa, codificada por el gen *ob*, que fue descubierta en 1994 en ratones. Está formada por 167 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la hormona pase al torrente circulatorio, de modo que la proteína final segregada tiene en realidad 146 aminoácidos. Su estructura tridimensional (Figura 2) presenta cuatro hélices alfa y un puente disulfuro entre las cisteínas en posición 96 y 146, siendo este último necesario para la actividad biológica de la hormona.

Es producida y secretada por los adipocitos, aunque se expresa en el hipotálamo, ovarios y placenta. En el hipotálamo, esta hormona estimula las neuronas anorexígenas y glucosensitivas, reduciendo la sensación de apetito **[Solomon, 2006]**. Además, la leptina incrementa el gasto energético, por lo que disminuye la eficiencia metabólica. Su expresión génica está regulada, entre otros factores, por la ingesta y por la insulina, la cual estimula la secreción de leptina en periodos de sobrealimentación. De este modo, los niveles de esta hormona se acogen a un modelo de ritmo circadiano relacionado, como se ha dicho, con la pauta de ingesta, y modulado por la insulina y otras hormonas. Su concentración aumenta a lo largo del día en humanos. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo responsable del valor máximo de leptina, parece ser que, además de la ingesta, el régimen de horas de luz/oscuridad y las horas de sueño del individuo son factores determinantes.

Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal oscilan en el intervalo de 3.7 a 11.1 ng/mL en mujeres y de 2.0 a 5.6 ng/mL en los hombres, mientras que en personas obesas se han observado niveles de leptina notablemente más altos, así como proporcionales a la masa de grasa corporal **[Considine, 1996; Rosicka, 2003; Orel, 2004]**. Por el contrario, sus niveles disminuyen en sujetos con anorexia nerviosa, demostrando que la regulación fisiológica de la leptina está relacionada con el estado nutricional. El ayuno y la malnutrición son dos situaciones asociadas a bajos niveles circulantes de leptina. Al mismo tiempo, se ha sugerido que la pérdida de peso que tiene lugar en determinadas condiciones patológicas se debe al aumento observado de los niveles de leptina **[Fantuzzi, 2000]**.

La función principal de la leptina es la de regular de forma natural la ingesta de alimentos. Cuando hay un exceso de grasa en el cuerpo, aumenta la concentración de esta hormona en el flujo sanguíneo, lo que constituye una señal (retroalimentación negativa) que informa al hipotálamo de que debe inhibir el apetito, activándose el consumo de energía (pérdida de grasa). Las células epiteliales mamarias humanas son capaces de sintetizar esta hormona, por lo que también está presente en la leche materna, en concentraciones entre 0.11 y 4.97 ng/mL **[Ilcol, 2006]**. Se ha sugerido que la leptina de la leche materna podría estar implicada en la regulación de la nutrición y el crecimiento postnatal, así como en la protección contra el sobrepeso en la edad adulta. Estos argumentos se han utilizado para explicar, en parte, el aumento del

riesgo de obesidad de los bebés alimentados con leche de fórmula con respecto a los alimentados con leche materna. También se ha propuesto la adición de leptina a la leche de fórmula comercial, que no la contiene **[Resto, 2001]**.

Actualmente se sabe que la leptina está implicada, *per se* o por sinergismo con otras citoquinas en la patogénesis de la inflamación y de trastornos autoinmunes como la diabetes tipo 1, la artritis reumatoide, o la inflamación intestinal. Se ha señalado la similitud estructural y funcional que muestran la leptina y su receptor con la IL-6 **[Fantuzzi, 2000]**. Por otro lado, desde su descubrimiento, no sólo se ha reconocido el papel de la leptina en la regulación del peso corporal, sino que se ha visto que esta proteína es un nexo entre los sistemas neuroendocrino y autoinmune, regulando el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, e interviniendo en la maduración del sistema reproductivo, y en procesos tan importantes como la hematopoyesis, la angiogénesis y el desarrollo fetal **[Fantuzzi, 2000]**.

### **3.2.2.2. Interleucina 6**

La interleucina 6 (IL-6) es un adipoquina pleiotrópica codificada en el ser humano por el gen IL-6 **[Ferguson-Smith, 1988]**. Es una glucoproteína de 22 a 27 kDa que consiste en una sola cadena polipeptídica de 185 aminoácidos que forma un haz de cuatro  $\alpha$ -hélices **[Somers, 1997]**. Esta proteína tiene un papel principal en la respuesta inflamatoria **[Wang, 2011L]**, y actúa tanto como una citoquina pro-inflamatoria como anti-inflamatoria **[Li, 2011]**. Así, como se ha dicho, la IL-6 secretada por los macrófagos para estimular la respuesta inmune, conduce a la inflamación. Pero al mismo tiempo, la IL-6 es un potente inductor de la respuesta de fase aguda por los hepatocitos, estimulando la producción de gran número de proteínas, como el fibrinógeno, antes señalado, lo que pone de manifiesto su papel anti-inflamatorio **[Engstrom, 2003]**.

La IL-6, junto con el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), son las dos citoquinas mejor estudiadas en relación con la obesidad **[Fantuzzi, 2005]**. En individuos sanos, los niveles séricos de IL-6 se encuentran en el entorno de los pg/mL **[Hong, 2007]**, por lo que su determinación en muestras clínicas requiere el uso de métodos muy sensibles **[Wang, 2014]**. Por otro lado, los niveles de IL-6 en suero de pacientes obesos, o afectados de otros procesos inflamatorios, o de otras enfermedades, pueden

aumentar hasta el orden de ng/mL. En casos de obesidad, se encuentran niveles de IL-6 elevados tanto en suero como en tejido adiposo blanco. Los adipocitos contribuyen al 30% de los niveles circulantes de IL-6. Estos niveles se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal. Sin embargo, con la pérdida de peso, los niveles descienden **[Bastard, 2002]**. En relación a esto, caben destacar estudios muy completos publicados acerca de la monitorización de IL-6 en pacientes obesos participantes en estudios de intervención basados en dieta y ejercicio **[Bruun, 2006]**.

Se ha sugerido que la IL-6 podría ser el nexo entre la inflamación, la obesidad, el estrés y la enfermedad cardiovascular **[Yudkin, 2000]**, destacando el importante papel de esta adipoquina en la patogénesis de los trastornos coronarios. También existen indicios de que los niveles elevados de IL-6 en el organismo pueden predecir la aparición de diabetes mellitus tipo 2 **[Pradhan, 2001]**. En relación a esto, también se ha publicado que el incremento crónico de IL-6 que sucede en la obesidad, está asociado al aumento de la resistencia a la insulina **[Trayhurn, 2011]**. Sin embargo, la administración aguda de IL-6 no produce variaciones en el metabolismo glucídico, lo que hace improbable que esta proteína esté vinculada *per se* a dicha patología **[Kroggh-Madsen, 2006]**.

Además de constituir un biomarcador adecuado de la obesidad, la IL-6 lo es también del cáncer de próstata **[May, 1992]** y del cáncer de cabeza y cuello (HNSCC) **[Malhotra, 2007]**. Se han encontrado niveles elevados de IL-6 en saliva de pacientes con neoplásica oral y lesiones preneoplásicas **[Sato, 2010]**, por lo que también se ha utilizado esta adipoquina como un biomarcador para la detección precoz y el cribado del cáncer de lengua **[Liu, 2012]**. Se han notificado niveles relativamente altos de IL-6 en orina después de un trasplante renal y durante episodios de rechazo agudo **[Van Oers, 1988]**. Por otra parte, la determinación de la concentración de IL-6 en orina se considera una herramienta de diagnóstico útil para el reconocimiento temprano de la pielonefritis (infección urinaria alta) aguda en niños **[Sheu, 2006]**, encontrándose en estos casos niveles superiores a 15 pg/mL **[Rodríguez, 2008]**. Finalmente, altas concentraciones de IL-6 y de algunas proteínas de fase aguda aparecen en las muestras biológicas de pacientes con psoriasis, artritis inflamatoria, enfermedad cardiovascular y enfermedad inflamatoria intestinal **[Peng, 2011]**.

### 3.2.2.3. Adiponectina

La adiponectina (APN), también llamada hormona adipoQ, es una proteína de aproximadamente 30 kDa, compuesta por 247 aminoácidos. Es la adipoquina que presenta una mayor expresión en los adipocitos y, en condiciones fisiológicas normales, se expresa exclusivamente en éstos **[Maeda, 1996; Scherer, 1995]**. En plasma se encuentra presente en concentraciones de 5-30 µg/mL, constituyendo aproximadamente el 0.01% del total de las proteínas plasmáticas humanas. Los valores de concentración exactos dependen del sexo, siendo menor el nivel de APN en los hombres que en las mujeres, y también de la edad o la etnia. Esta proteína aparece en el flujo sanguíneo en tres formas principales: trímero, hexámero, y como adiponectina de alto peso molecular (HMW, 12 a 18 subunidades) **[Kadowaki, 2006]**. Al conjunto, conocido como adiponectina total, se le han atribuido funciones antidiabéticas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antiaterogénicas y antioncogénicas. Una de las características más importantes de la adiponectina es que, a diferencia de otras adipoquinas, su expresión en el tejido adiposo y su concentración sérica se correlacionan negativamente con el índice de masa corporal **[Brichard, 2003]**.

La adiponectina regula el metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un incremento de la sensibilidad a la insulina. Además, inhibe las fases iniciales de la aterosclerosis, ya que reduce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas, la expresión del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la proliferación de células de tejido muscular liso.

Se ha visto que los niveles de adiponectina en plasma disminuyen en pacientes con diabetes tipo 2 o con enfermedades cardiovasculares **[Ouchi, 2007]**. Además, se sabe que los mecanismos subyacentes que inducen un decrecimiento de la producción de adiponectina involucran un entorno hormonal anormal **[Delporte, 2002; Halleux, 2001]**, estrés oxidativo **[Furukawa, 2004]**, y un estado pro-inflamatorio **[Bruun, 2003]**, condiciones que prevalecen en la obesidad y el síndrome metabólico. Por otro lado, la expresión génica de la adiponectina es reducida por el TNF- $\alpha$ , IL-6, agonistas  $\beta$  adrenérgicos o glucocorticoides **[Havel, 2004]**. La cuantificación de la concentración de adiponectina plasmática podría permitir la caracterización de los pacientes en función

del riesgo de desarrollar complicaciones. Asimismo, cualquier fármaco que aumente la concentración de adiponectina o estimule su acción podría tener una potencial aplicación terapéutica en el tratamiento de las enfermedades citadas.

### 3.2.3. Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas derivan del colesterol (ver Figura 3) y son producidas en el sistema nervioso central, el hígado, la placenta, los testículos, la corteza suprarrenal y ovarios. Son hormonas específicas encargadas de secretar sustancias como estrógeno, testosterona, aldosterona, cortisol y ACTH. Todas las hormonas esteroideas tienen el mismo anillo ciclopentano-perhidrofenantreno característico del propio colesterol. Se trata de hormonas lipídicas que pueden atravesar la membrana celular y unirse a los receptores para provocar cambios celulares. Se transportan generalmente en la sangre, unidas a un transportador proteico específico como la globulina fijadora de hormonas sexuales. Las conversiones y el catabolismo adicional se producen en el hígado, en tejidos periféricos y en los tejidos objetivo.

Estas hormonas influyen decisivamente en la distribución de la grasa corporal y afectan a la fisiología de los adipocitos. Los estrógenos y sus receptores regulan varios aspectos del mecanismo de las grasas y la glucosa, por lo que las alteraciones en sus niveles pueden llevar a la aparición del síndrome metabólico y a un aumento del riesgo cardiovascular. En las mujeres, la ausencia de estrógenos en la menopausia, provoca además variaciones en el perfil lipídico y la acumulación preferencial de grasa en el abdomen. Los mecanismos exactos del aumento de la obesidad en las mujeres menopáusicas no se conocen, pero se sabe que, además de lo ya señalado, la deficiencia de estrógenos aumenta la predisposición a la diabetes de tipo 2 y a las enfermedades cardiovasculares **[Mauvais-Jarvis, 2011]**.

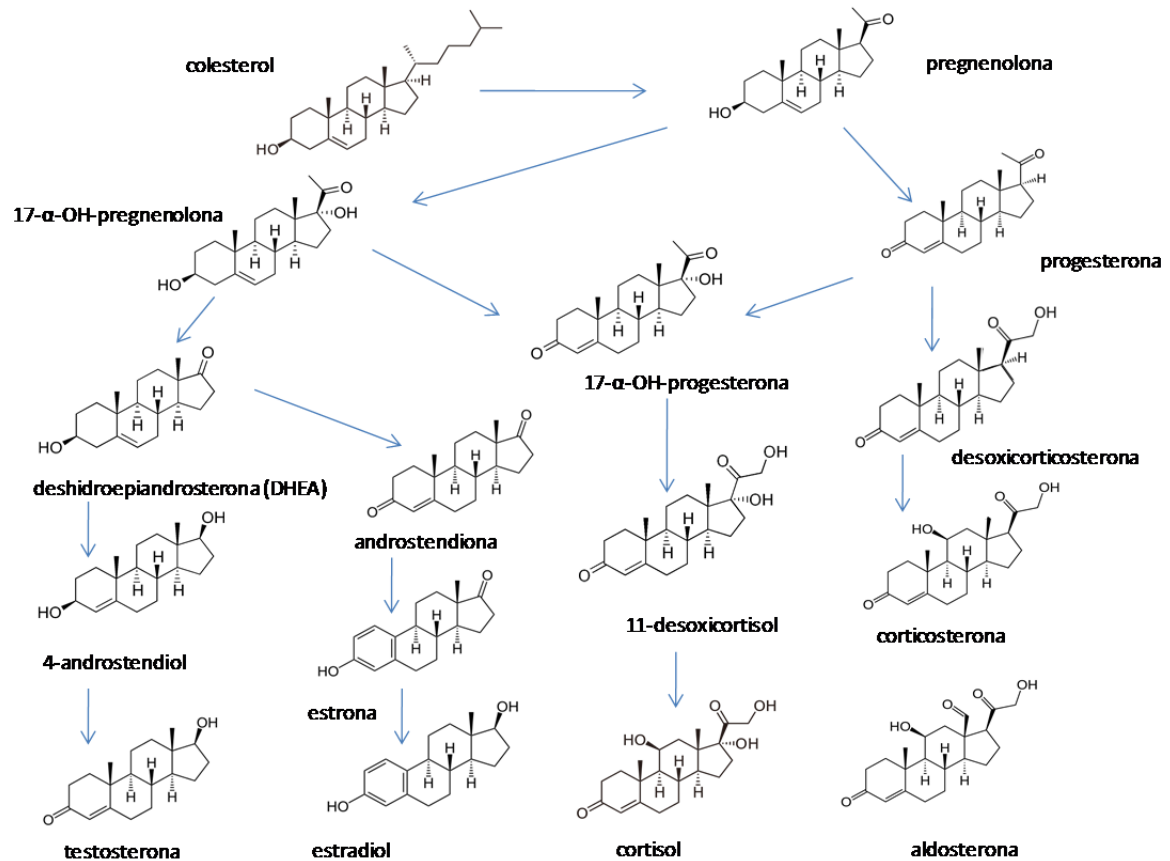
Para la realización de este trabajo se ha elegido una hormona esteroidea representativa, el estradiol, describiéndose a continuación sus propiedades específicas más relevantes en el ámbito de la obesidad y de las enfermedades relacionadas.

### 3.2.3.1. Estradiol

El estradiol (E2 o 17 $\beta$ -estradiol) es una hormona esteroidea sexual femenina. Durante los años reproductivos, la mayor parte del estradiol en las mujeres es generado en las células granulosas de los ovarios por aromatización de la androstendiona (ver Figura 3). Esta última, formada en las células foliculares tecaes, da lugar a estrona, que finalmente se transforma en estradiol por acción de la enzima 17 $\beta$ -betahidroxiesteroide deshidrogenasa. También se producen pequeñas cantidades de estradiol en la corteza suprarrenal y, en los hombres, en los testículos. Los niveles de estradiol encontrados en hombres (8-55 pg/mL) son comparables a los de las mujeres postmenopáusicas (4-14 pg/mL), mientras que éstos son superiores en mujeres premenopáusicas, comprendidos entre 41 y 272 pg/mL [Sato, 1996; Wang, 2001; Xin, 2008].

Se ha observado un aumento de la producción de estrógenos en las personas con obesidad importante, incrementándose la concentración plasmática de estradiol y estrona. La mujeres con obesidad abdominal tienen una tasa de producción de estrógenos elevada y presentan niveles mayores de testosterona libre y estradiol libre, mientras que las mujeres con distribución glúteo-femoral de la grasa producen gran cantidad de estrona debido a la aromatización periférica de los estrógenos [Álvarez-Castro, 2011]. En el hombre obeso, la concentración plasmática de la testosterona desciende significativamente, aumentando la síntesis periférica de los estrógenos cuando se comparan los valores en hombres de peso normal y de edad similares, situación que se normaliza progresivamente con la pérdida de peso [Giagulli, 1994; Serdula, 1993].

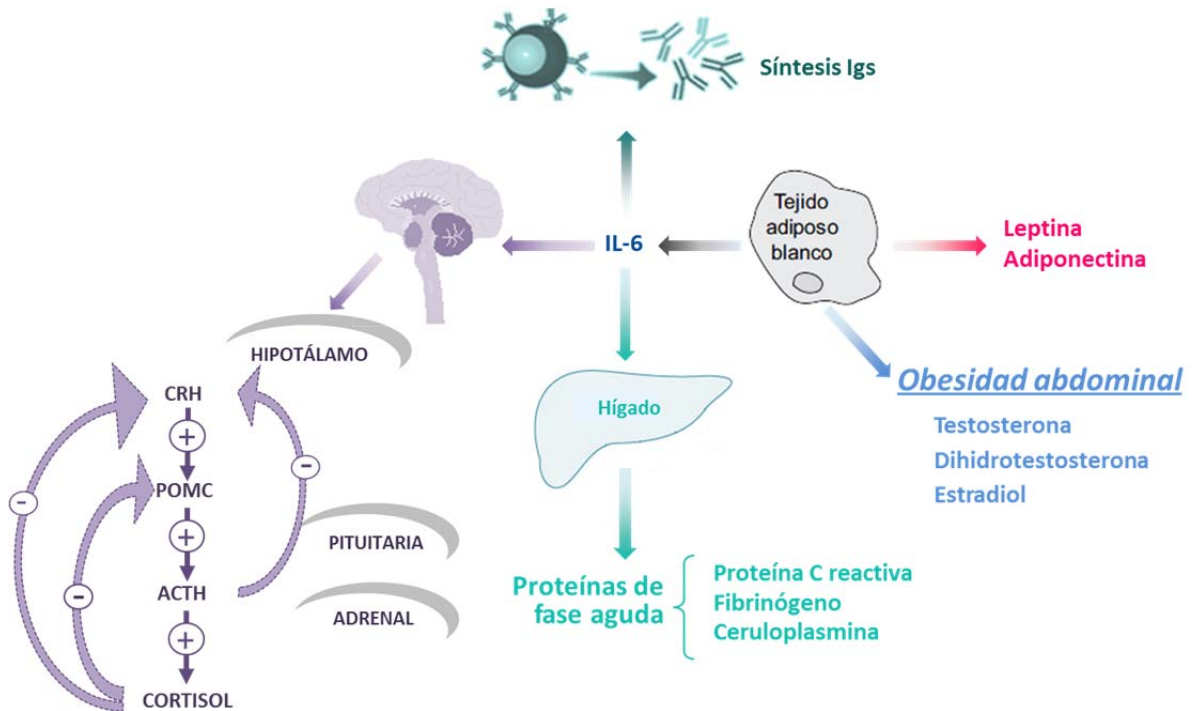
Los estudios más recientes destacan el importante papel del estradiol en la regulación del equilibrio energético [Hill, 2013; Mauvais-Jarvis, 2013]. Asimismo, se atribuye a la disminución de los niveles de esta hormona tras la menopausia, la ganancia de peso, la reducción de gasto energético y episodios de hiperfagia que se originan frecuentemente en este estado [Martínez de Morentin, 2014].



**Figura 3.** Esquema de la síntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol

La mayor parte de las determinaciones de estradiol se realizan en las mujeres y reflejan la actividad de los ovarios, detectándose trastornos como la amenorrea o la disfunción menstrual, así como estados de hipoestrogenismo y menopausia. Asimismo, la monitorización de estrógenos durante las terapias de fertilidad permite evaluar el crecimiento folicular. Niveles persistentemente altos de estradiol se producen en presencia de algunos tumores, mientras que concentraciones por debajo de lo normal aparecen en la insuficiencia ovárica o el síndrome de Turner, y puede aparecer tras una rápida pérdida de peso. La determinación de la concentración de estradiol en suero y orina es de interés en estados de postmenopausia, hiperandrogenismo y cáncer de mama [Kuramitz, 2003].

En la Figura 4 se esquematiza la respuesta fisiológica del organismo ante el aumento de tejido adiposo, con la consiguiente alteración en la producción de los marcadores de obesidad.



**Figura 4.** Esquema de la respuesta fisiológica del organismo ante el aumento de tejido adiposo sobre los analitos estudiados

### 3.3. INMUNOENSAYOS E INMUNOSENSORES

Los ensayos de afinidad hacen uso de un receptor adecuado que interacciona con el analito objeto de estudio permitiendo el reconocimiento del mismo. Para el desarrollo de estos ensayos se han empleado diferentes receptores: anticuerpos, aptámeros, proteínas de afinidad y polímeros de impronta molecular. Aunque el uso de receptores no biológicos para el reconocimiento de diferentes analitos ha dado lugar, en casos puntuales, a interesantes prestaciones analíticas, actualmente los sistemas basados en receptores biológicos superan en mucho las características mostradas por los anteriores, proporcionando un funcionamiento analítico relevante. Por otro lado, entre los ensayos de afinidad basados en reactivos de origen biológico, aquellos que emplean anticuerpos para el reconocimiento selectivo del analito han sido los más estudiados y explotados para la preparación de biosensores con interesantes características y aplicaciones.

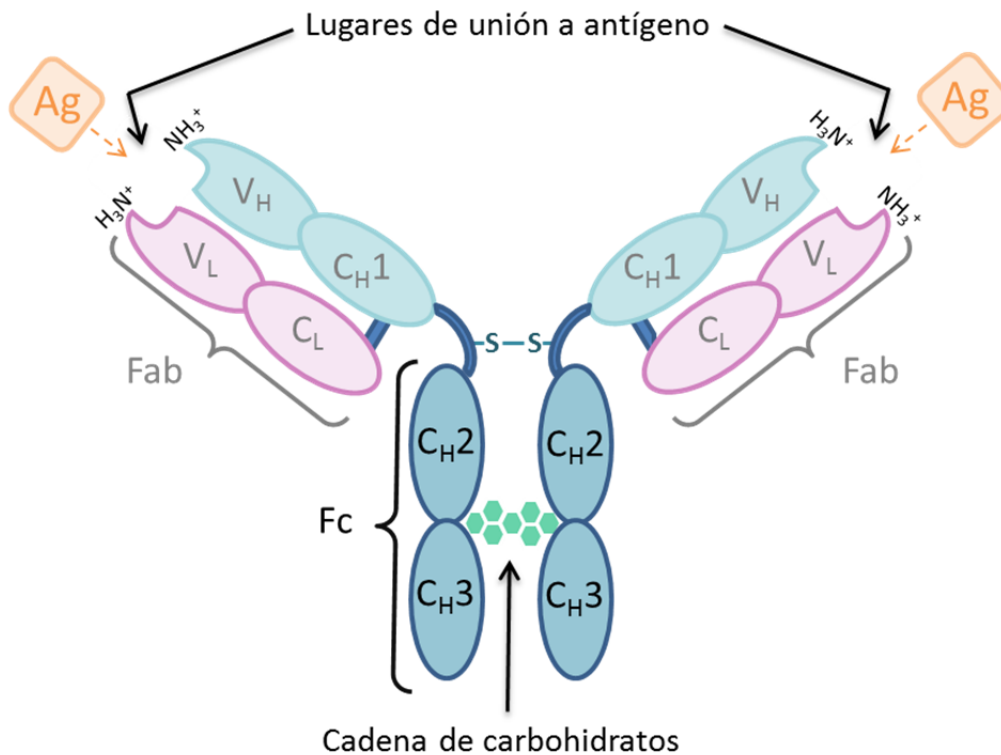
#### **Anticuerpos**

La presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas para un determinado organismo desencadena la producción de anticuerpos. Los anticuerpos

son un pequeño grupo de glicoproteínas que participan en el sistema inmune enlazándose a esas sustancias (antígenos), para marcarlas y destruirlas posteriormente. Los anticuerpos pertenecen a la familia de las proteínas globulares denominadas inmunoglobulinas, y se encuentran presentes en diversos fluidos de los animales vertebrados, principalmente en el suero sanguíneo [Elgert, 1998].

Existen cinco clases de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) designadas como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que se diferencian entre sí en sus propiedades fisicoquímicas y serológicas. La inmunoglobulina G es la que se encuentra en mayor proporción en la sangre, constituyendo más del 70 % (aproximadamente 12.5 mg/mL) de las Igs séricas totales [Elgert, 1998]. También es la más empleada en el análisis inmunoquímico. Cada IgG está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente, agrupadas de tal manera que existe una proximidad espacial entre los cuatro extremos amínicos de las cadenas ligeras y pesadas por una parte, y entre los dos extremos carboxílicos de las cadenas pesadas por otra. Cada cadena presenta una región variable (V) situada en los extremos amino terminal ( $V_H$ ,  $V_L$ ) que exhibe una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Por el contrario, las secuencias de aminoácidos situadas en los extremos carboxilo son prácticamente idénticas, por lo que cada una de las cadenas ( $C_H$ ,  $C_L$ ) se denominan región constante (C) [Stryer, 2003].

Las IgG constan, además, de tres fragmentos (Figura 5), uno denominado  $F_c$ , que contiene el alotipo y determina la actividad biológica y la clase de cadena pesada, y dos denominados  $F_a_b$ , que contienen el idiotipo y es por donde la molécula se une al antígeno.

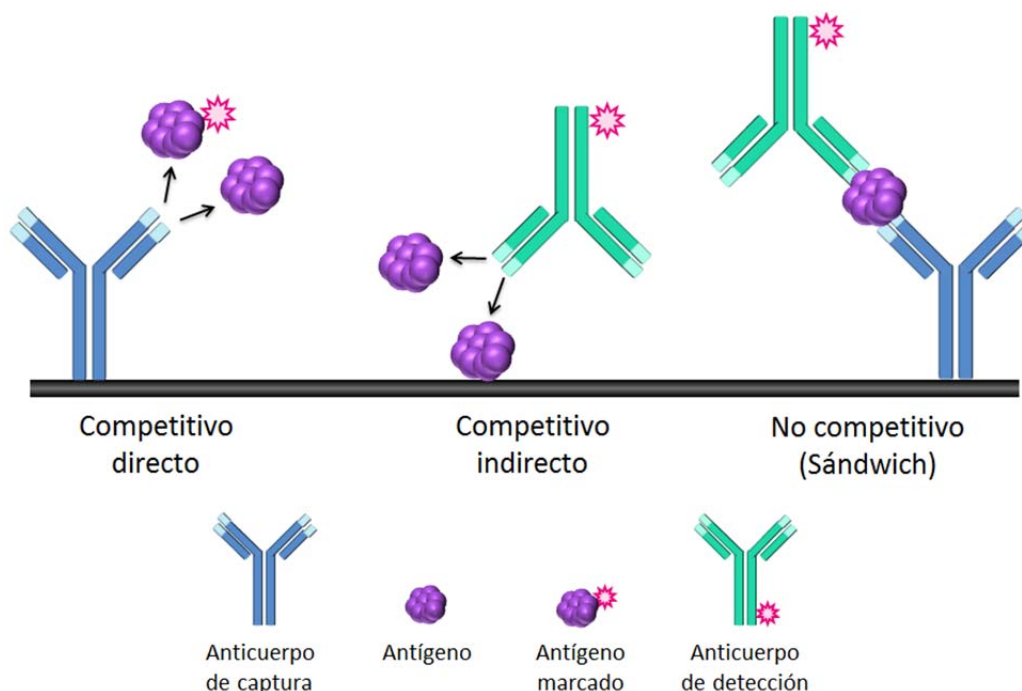


**Figura 5.** Esquema de la estructura de la IgG en la que se indican los diferentes dominios.

### 3.3.1. Tipos de inmunoensayos

Un inmunoensayo es una prueba que hace uso de la formación de complejos antígeno-anticuerpo como medio para cuantificar moléculas de interés biológico basándose en la especificidad de la reacción de reconocimiento que tiene lugar. En función del diseño, los inmunoensayos pueden clasificarse en diferentes tipos (Figura 6). Dentro de los formatos competitivos se distinguen el **competitivo directo**, en el que el antígeno compite con un análogo marcado por los sitios de unión de un anticuerpo de captura inmovilizado, y el **competitivo indirecto**, en el que el antígeno en disolución y el antígeno inmovilizado compiten por los sitios de unión a un anticuerpo de detección. En estos formatos, la respuesta obtenida es inversamente proporcional a la concentración de antígeno, ya que a medida que aumenta ésta, menor cantidad de antígeno marcado o inmovilizado se unirá al anticuerpo, lo que producirá una disminución en la señal analítica [Jiang, 2008]. En el **formato tipo sándwich** un anticuerpo de captura permite la inmovilización del antígeno para su posterior reconocimiento con un anticuerpo de detección. En este caso la señal obtenida es

directamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. En general, este formato proporciona una mayor sensibilidad y selectividad.



**Figura 6.** Representación esquemática de los principales formatos empleados en inmunoensayos basados en el uso de inmunorreactivos marcados.

### 3.3.2. Inmunosensores electroquímicos

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

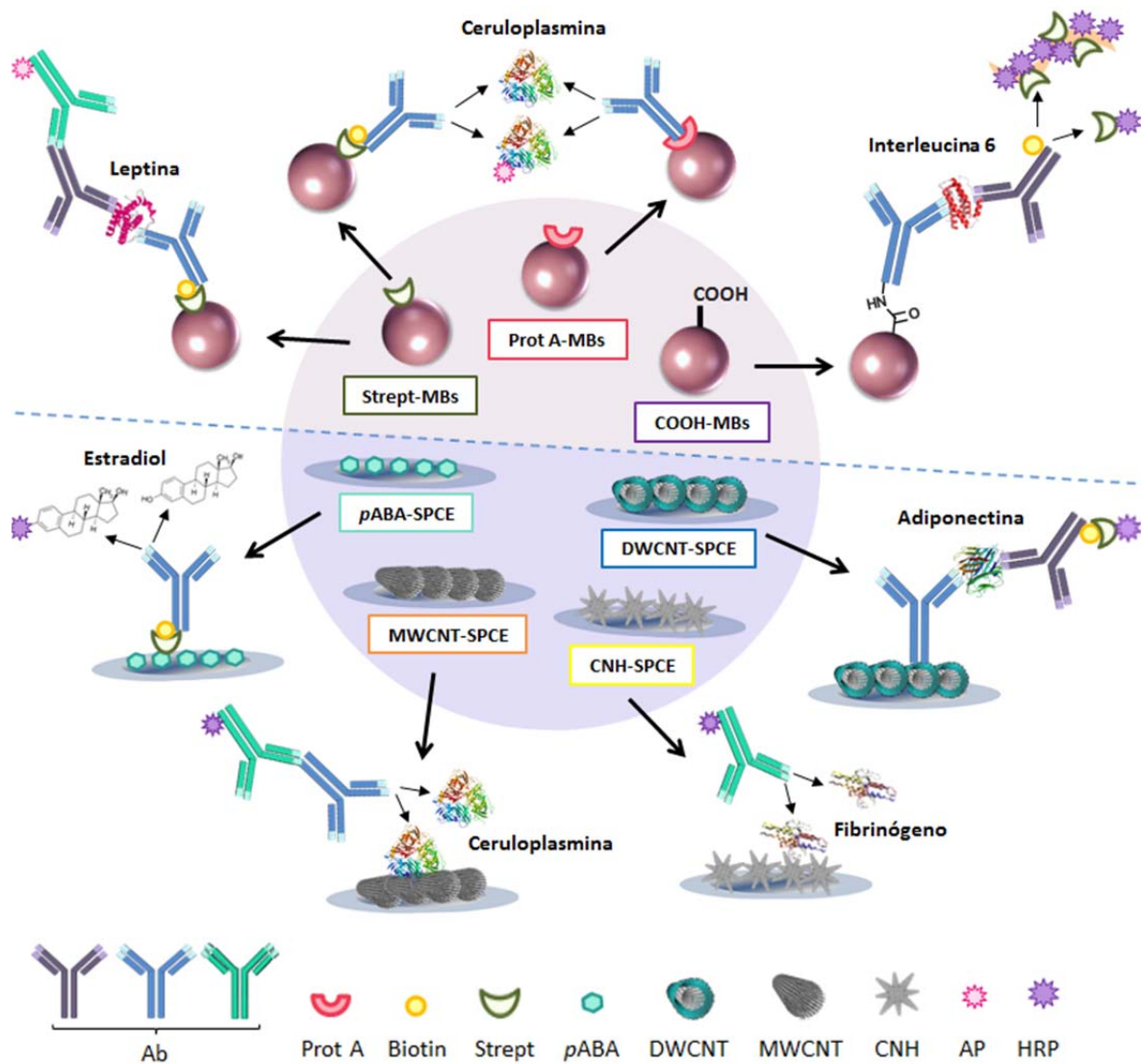
Dentro de los inmunosensores, los basados en detección electroquímica poseen diversas ventajas que los consolidan como métodos de transducción ampliamente utilizados. Entre estas ventajas cabe citar la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas, que posibilita la monitorización de volúmenes pequeños de muestra, lo que hace que los inmunosensores electroquímicos sean especialmente adecuados para la monitorización “in vivo”. Además son altamente sensibles, sencillos, de fácil manejo, bajo coste y fácil miniaturización [Al-Khafaji, 2012].

Sin embargo, presentan dos limitaciones principales: por un lado, las elevadas constantes de afinidad de las interacciones inmunoquímicas hacen que una regeneración óptima de las fases sensoras diseñadas sea cuando menos difícil y en muchos casos imposible. Por otro, el uso generalizado de marcadores para la generación de la señal analítica implica la adición de otros reactivos no integrados en la fase sensora. A pesar de que la detección directa de la interacción molecular se ha realizado con determinados dispositivos, ésta es por lo general poco sensible.

Las diversas configuraciones de inmunosensores electroquímicos constituyen excelentes alternativas a los métodos de inmunoensayo ELISA convencionales debido a que, además de presentar las limitaciones anteriores, se caracterizan por un elevado coste, procedimientos complicados de lavado y de preparación de la muestra, largos tiempos de detección y difícil automatización y miniaturización. [Ghindilis, 1998].

#### **3.3.2.1. Inmunosensores desarrollados**

En este trabajo se han empleado las tres configuraciones de inmunoensayos mencionadas en el apartado 3.3.1 para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la determinación de leptina, interleucina 6, ceruloplasmina, estradiol, adiponectina y fibrinógeno, que se han aplicado a muestras de suero humano, plasma, orina, saliva o leche. Como se ha señalado, las configuraciones de los inmunosensores desarrollados se han basado en el empleo de partículas magnéticas (magnetoinmunosensores), otro de ellos en la modificación de la superficie eléctrica con la técnica de *grafting*, para la generación de grupos carboxílicos, y el último grupo de inmunosensores se basa en el empleo de distintos nanomateriales de carbono carboxilados: nanotubos de pared múltiple, nanotubos de carbono de pared doble y nanocuernos de carbono. Sobre las plataformas eléctricas elegidas, se han aplicado diferentes estrategias de inmovilización de las biomoléculas, dando lugar todo ello al conjunto de diseños que, a modo de resumen, se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Representación esquemática de los inmunosensores desarrollados.

Abreviaturas: **Ab**: anticuerpo; **AP**: fosfatasa alcalina; **Biotin**: biotina; **CNH**: nanocuernos de carbono; **DWCNT**: nanotubos de carbono de pared doble; **HRP**: peroxidasa; **MBs**: partículas magnéticas; **MWCNT**: nanotubos de carbono de pared múltiple; **pABA**: ácido p-aminobenzoico; **Prot A**: proteína A; **Strept**: estreptavidina.

### 3.4. EMPLEO DE MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL DESARROLLO DE INMUNOSENSORES

Desde hace algunos años, las partículas magnéticas de distintos tamaños (microesferas o nanoesferas) han despertado el interés como materiales de gran utilidad para la preparación de inmunosensores. En ellas existen campos magnéticos de origen atómico producidos por un dipolo o un momento magnético, quedando todos ellos perfectamente orientados y unidos por una fuerza cohesiva [Sánchez, 2005]. Este tipo de material se utiliza frecuentemente como soporte de otros de

reactividad química selectiva que forman un recubrimiento estable, originando así un elemento de volumen relativamente pequeño y de superficie funcionalizada que, además, se puede transportar y conducir por aplicación de campos magnéticos externos con ayuda de un imán.

Precisamente, la posibilidad de manipulación por atracción magnética de las partículas representa una de sus mayores ventajas, ya que facilita la separación de las biomoléculas inmovilizadas sobre ellas de otras no inmovilizadas, así como de las disoluciones de lavado, o del exceso de reactivos. A esta ventaja se añade la elevada área superficial disponible para el proceso de inmovilización, que proporciona una alta población de moléculas biológicas, lo que mejora las características analíticas del inmunosensor **[Centi, 2007]**.

Existen distintos tipos de micropartículas magnéticas, que se caracterizan por poseer diferentes grupos funcionales capaces de interactuar con las posiciones de unión de antígenos y anticuerpos. Entre ellas destacan las micropartículas carboxiladas y tosiladas, para la inmovilización covalente de biomoléculas, así como las modificadas con proteína A, proteína G o estreptavidina, para su inmovilización por afinidad. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de micropartículas magnéticas, mostrándose su aplicación a la determinación de diferentes analitos de interés.

En la mayoría de los casos, las micropartículas modificadas se inmovilizan sobre electrodos serigrafiados con ayuda de un imán colocado debajo de su parte activa. En una de las aplicaciones, Hervás y colaboradores desarrollaron un inmunosensor electroquímico para la detección de zearalenona en comida para bebés con un bajo límite de detección, mediante inmunoensayo competitivo, directo inmovilizando el anticuerpo sobre micropartículas modificadas con proteína G, depositando los magnetoinmuno-conjugados sobre un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) **[Hervás, 2010]**. En otras aplicaciones se diseñaron otros formatos de magnetoinmunosensores en los que las partículas magnéticas se atrapaban dentro de una matriz compósita que contenía un imán en su interior. De acuerdo con esta estrategia se diseñó un inmunosensor basado en un electrodo de grafito-epoxi y micropartículas tosiladas aplicado a la determinación de antibióticos de la familia de

las sulfonamidas en leche [Zacco, 2007]. El mismo grupo de investigación aplicó este mismo formato a la determinación de ácido fólico en leche [Lermo, 2008].

En nuestro Grupo de Investigación se han desarrollado varias configuraciones de inmunosensores magnéticos. Por ejemplo, se preparó un inmunosensor de tipo sándwich para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en orina empleando micropartículas modificadas con proteína A y electrodos serigrafados de oro (SPAuE) con TTF inmovilizado [Campuzano, 2010], así como otro basado en un ensayo competitivo directo empleando estas mismas micropartículas para la determinación de cortisol en muestras de suero, consiguiéndose en este caso un límite de detección de 3.5 pg/mL, veinte veces menor que el obtenido con otros inmunosensores no magnéticos descritos en la bibliografía [Moreno-Guzmán, 2010]. Las micropartículas recubiertas de avidina o estreptavidina se pueden utilizar para enlazar fácilmente inmunorreactivos o antígenos biotinilados. Un ejemplo del empleo de esta estrategia es la configuración de tipo sándwich desarrollada para la determinación de prolactina, aplicada con éxito al análisis de suero humano [Moreno-Guzmán, 2011]. En cuanto al uso de micropartículas magnéticas para la inmovilización covalente de biomoléculas, cabe citar el magnetoinmunosensor desarrollado por Serafín y col. para la determinación de la hormona del crecimiento humano basado en el empleo de micropartículas magnéticas tosiladas sobre las que se inmovilizó covalentemente el anticuerpo de captura [Serafín, 2012]. Las excelentes características analíticas son adecuadas para su aplicación a la determinación de esta hormona en muestra de suero. Así mismo, Escosura-Muñiz y col. desarrollaron un inmunosensor para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis B [Escosura-Muñiz, 2010]. Para su preparación, también se emplearon micropartículas magnéticas tosiladas sobre las que el antígeno se inmovilizó covalentemente, realizando un ensayo tipo sándwich con nanopartículas de oro (AuNPs) como marcador electroactivo. El límite de detección obtenido con este diseño, 3 mIU/mL, está por debajo de los niveles de seroprotección ( $\geq 10$  mIU/mL). Romanazzo y col. emplearon estas mismas partículas para la determinación de desoxinivalenol, una micotoxina perteneciente al grupo de los tricotecenos. Para ello diseñaron un formato de inmunoensayo competitivo indirecto inmovilizando primero el antígeno e incubando después en una mezcla del antígeno y la fracción Fab del anticuerpo biotinilado. Por último, la cuantificación se realizó

mediante el complejo avidina-peroxidasa biotinilada, por amperometría sobre un electrodo serigrafiado de 8 canales. Es de destacar la robustez del inmunosensor desarrollado, así como la ausencia de efecto matriz en el análisis de muestras tan complejas como cereales de desayuno y alimentos para bebés [Romanazzo, 2010]. Otra aplicación de estas micropartículas fue la dedicada a la determinación de microorganismos patógenos. Así, Chan y col. pusieron a punto un magnetoinmunosensor electroquímico de tipo sándwich capaz de detectar 10 cfu/mL de una de las cepas bacterianas más frecuentemente implicada en procesos de intoxicación alimentaria, la *E.coli* O157:H7 [Chan, 2013].

Las micropartículas magnéticas se han empleado también como medio de amplificación de las señales analíticas. Por ejemplo, Mani y col. diseñaron un inmunosensor para la detección del antígeno prostático específico (PSA), inmovilizando el anticuerpo primario sobre un electrodo de grafito pirolítico modificado con nanopartículas de oro mediante la técnica *layer-by-layer*. A continuación se estableció una configuración tipo sándwich empleando un bioconjugado del anticuerpo secundario anti-PSA y la enzima peroxidasa unidos covalentemente a la superficie de micropartículas carboxiladas. La gran cantidad de marcador enzimático inmovilizado sobre la superficie de las micropartículas permitió alcanzar un límite de detección de 0.5 pg/mL en suero humano [Mani, 2009].

Tabla 1. Inmosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas

Electrodo / Tipo de MBS	Tipo de inmunoensayo	Protocolo para la determinación	Técnica	Análito / Muestra	Características analíticas	Ref.
SPCE/ Prot G-MBS	Competitivo directo	HRP-Zearalenona + Zearalenona/ anti-Zearalenona/Prot G-MBS Mediador: HQ	DPV 0.20 a -0.30 V	Zearalenona / Comida para bebés	IL: 0.011 – 1000 µg/L IC <sub>50</sub> = 0.088 µg/L LD: 0.007 µg/L	Hervás, 2010
SPCE/ProtG- MBS+ HisTag-MBS	Competitivo directo	HRP-PENG + PENG/PBP/HisTag-MBS HRP-SPY + SPY/anti-SPY/ProtG-MBS HRP-TC + TC/anti-TC/ProtG-MBS	Amperom. E = -0.2 V	PENG, SPY y TC / leche	ID: 2.3-57.3 ng/mL; LD: 0.9 ng/mL ID: 9.8-179 ng/mL; LD: 4.2 ng/mL ID: 12-676 ng/mL; LD: 3.9 ng/mL	Conzuelo, 2014
SPAUE-TTF/ Prot A-MBS	Sándwich	HRP-anti-S. pneumoniae/ /S. pneumoniae/anti-S. pneumoniae/ Prot A-MBS Mediador: TTF	Amperom. E = -0.15 V	S. pneumoniae / orina	IL: 4.3x10 <sup>4</sup> - 1x10 <sup>7</sup> cfu/mL (Dawn) y 7.5x10 <sup>5</sup> - 1x10 <sup>8</sup> cfu/mL (R6) LD: 1.5x10 <sup>4</sup> cfu / mL (Dawn) y 6.3x10 <sup>5</sup> cfu / mL (R6)	Campuzano, 2010
SPCE/ Prot A-MBS	Competitivo directo	AP-cortisol/cortisol/anti-cortisol/ /Prot A-MBS Sustrato: naftilfosfato	DPV -0.15 a 0.60 V	Cortisol / suero	IL: 5x10 <sup>-3</sup> - 150 ng/mL EC <sub>50</sub> : 0.19 ng/mL LD: 3.5 pg/mL	Moreno- Guzmán, 2010
SPCE/ Prot A-MBS	Competitivo directo	HRP-testosterona + testosterona/ /anti-testosterona/Prot A-MBS Mediador: HQ	Amperom. E = -0.2 V	Testosterona / suero	IL: 5.0x10 <sup>-3</sup> - 50 ng/mL LD: 1.7 pg/mL	Eguílaz, 2010
SPCE/ Strept-MBS	Sándwich	AP-PRL + PRL/anti-PRL-biotin/ Strept-MBS/ Sustrato: naftilfosfato	DPV -0.15 a 0.60 V	PRL / suero	IL: 10 - 2000 ng/mL LD = 3.74 ng/mL	Moreno- Guzmán, 2011
SPAUE/Strept- MBS	Sándwich	HRP-anti-cTnT/cTnT/anti-cTnT-biotin/ /Strept-MBS Mediador: TMB	Amperom. E = -0.1 V	cTnT / suero	LD: 0.017 ng/mL	Esteban- Fernández de Ávila, 2014
Grafito-PDDA- AuNPs/HOOC- MBS	Sándwich	HRP-anti-PSA-MBS/PSA/anti-PSA/AuNPs Mediador: HQ	Amperom. E = -0.2 V	PSA / suero	IL: 1 - 10 pg/mL LD: 0.5 pg/mL	Mani, 2009
SPCE/HOOC- MBS	Competitivo indirecto y sándwich	HRP-anti-DD + DD/DD/HOOC-MBS HRP-anti-DD/DD/anti-DD/HOOC-MBS	Amperom. E = -0.2 V	DD / suero	Competitivo indirecto: IL: 0.084–1.9 µg/mL; LD: 0.028 µg/mL Sándwich: IL: 0.06–1.0 µg/mL; LD: 0.020 µg/mL	Gamella, 2012
SPCE/HOOC- MBS	Sándwich	HRP-Strept/biotin-anti-CRP/CRP/ anti-CRP/HOOC-MBS Mediador: TMB	Amperom. E = -0.1 V	CRP / suero certificado	IL: 0.07 - 1000 ng/mL LD: 0.021 ng/mL	Esteban- Fernández de Ávila, 2013

**Tabla 1.** Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas (continuación).

Electrodo / Tipo de MBs	Tipo de inmunoensayo	Protocolo para la determinación	Técnica	Analito / Muestra	Características analíticas	Ref.
SPCE/HOOC-MBs	Sándwich	HRP-Strept/anti-Lp(a)-biotin/ /Lp(a)/anti-Lp(a)/HOOC-MBs Mediador: HQ	Amperom. E = -0.2 V	Lp(a) / suero	IL: 0.01 - 0.5 µg/mL LD: 4 ng/mL	Kaçar, 2015
m-GECE/ Tosilo-MBs	Competitivo directo	HRP-SFM + SFM/anti-SFM/Tosilo- MBs/m-GECE Mediador: HQ	Amperom. E = -0.15 V	SFM / leche	IL: 4.2 - 175 µg/L EC <sub>50</sub> : 25.5 µg/L LD: 1.44 µg/mL	Zacco, 2007
m-GCE/Tosilo- MBs	Competitivo indirecto	HRP-anti-AF + AF-BSA/AF/Tosilo-MBs Mediador: HQ	Amperom. E = -0.15 V	ácido fólico / leche desnatada	IL: 21.1 - 129.3 nmol/L EC <sub>50</sub> : 46.6 nmol/L LD: 13.1 nmol/L	Lermo, 2008
SPCE/ Tosilo-MBs	Sándwich	AuNPs-anti-(anti-αHBSAg)/anti- αHBSAg/αHBSAg/Tosilo-MBs Reduc. catalítica de H <sup>+</sup>	Amperom. de pulso E <sub>1</sub> = +1.35 V, 1min E <sub>2</sub> = -1.0 V, 5 min	anti-αHBSAg / suero	IL: 5 - 69.2 mIU/mL LD= 3 mIU/mL	Escosura- Muñiz, 2010
SPCE (8 canales) /Tosilo-MBs	Competitivo indirecto	HRP-biotin/avidina/anti-DON- biotin/DON-DSC-cHSA/Tosilo-MBs	Amperom. E = -0.1 V	DON / cereales y alimentos para bebés	IL: 100 - 4500 ng/mL LD: 63 ng/mL EC <sub>50</sub> : 380 ng/mL	Romanazzo, 2010
SPCE/Tosilo-MBs	Sándwich	AP-anti-IgG/anti-hGH/hGH/anti-hGH/ Tosilo-MBs	SWV	hGH / suero	IL: 0.01 - 100 ng/mL LD: 0.005 ng/mL	Serafin, 2012
Pt/Tosilo-MBs	Sándwich	anti-E.coli/E.coli/anti-E.coli/Tosilo-MBs	EIS 50mVpp 1-10 Hz	E. coli / cultivos de bacterias	LD: 10 cfu/mL	Chan, 2013

**Abreviaturas:** AF: ácido fólico; amperom.: amperometría; AP: fosfatasa alcalina; AuNPs: nanopartículas de oro; cfu: unidades formadoras de colonias; DON: desoxinivalenol; DON-DSC-cHSA: desoxinivalenol (DON) conjugado con N,N'-disuccinimidil carbonato (DSC) y albúmina de suero humano carbamida (cHSA); DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; GCE: electrodo de carbono vitrificado; GECE: electrodo compuesto grafito-epoxi; αHBSAg: antígeno de superficie de hepatitis B; HQ: hidroquinona; HRP: peroxidasa de rábano; IL: intervalo lineal; LD: límite de detección; MBs: partículas magnéticas; mIU/mL: miliunidades internacionales por mililitro; PCBs: bifenilos policlorados; PDDA: cloruro de poli(dialildimetilamonio); SFM: sulfonamida; Prot. A: proteína A; Prot G: proteína G; PSA: antígeno específico de cáncer próstata; SA: sulfonamidas; PENG: penicilina G; SPCE: electrodo serigráfico de carbono; SPY: sulfapiridina; Strept: estreptavidina; TC: tetraciclina; TTF: tetratíafulvaleno

### 3.5. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES BASADOS EN LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA

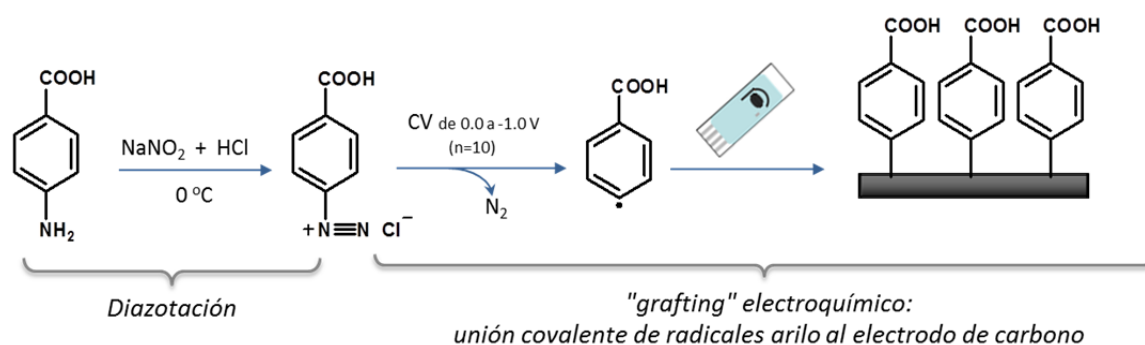
En el diseño de un sensor electroquímico la superficie sensora juega un papel importante. En la superficie de los materiales de carbono pueden crearse distintos tipos de grupos funcionales oxigenados mediante técnicas de grafting, que serán los puntos de anclaje necesarios para el proceso de inmovilización.

Por otra parte, cada vez es más necesario desarrollar nuevos transductores que mejoren la sensibilidad del sensor y que sean susceptibles de adaptarse a la gran demanda social que supone el control de biomarcadores que faciliten el diagnóstico precoz de las enfermedades. La nanoestructuración del electrodo de trabajo va a hacer posible el nacimiento de transductores de nueva generación que en general van a ampliar su campo de aplicación sin encarecer demasiado su coste [González, 2010].

#### 3.5.1. *Grafting electroquímico*

Los procedimientos más frecuentemente utilizados para la preparación de inmunosensores basados en electrodos de carbono, se basan en la creación de grupos oxigenados superficiales que puedan ser utilizados para la inmovilización posterior de las biomoléculas. Una forma muy adecuada de generar estos grupos es la aplicación de las técnicas de "grafting" o injertado. Una vez presentes estos grupos, es posible unir directamente los inmunorreactivos a la superficie electródica, o bien incorporar otras moléculas como la estreptavidina, o funciones apropiadas para la inmovilización posterior, como por ejemplo, derivados del ácido borónico, capaces de interaccionar con las regiones glicosiladas de los anticuerpos [Bélanger, 2011]. Estos métodos se caracterizan por su simplicidad y por proporcionar monocapas estables y compactas de radicales arilo sobre las superficies de carbono [Liu, 2000].

Los métodos de "grafting" utilizados con mayor frecuencia para modificar las superficies de carbono son dos. El primero se basa en la reducción electroquímica de una sal de diazonio, generándose un radical arilo que queda unido a la superficie del electrodo, con pérdida de nitrógeno (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de reacción de la reducción electroquímica de sales de diazonio

Como puede observarse en el esquema, la sal de aril diazonio se genera “in situ” a partir de un compuesto aromático aminado (en el ejemplo, el ácido 4-aminobenzoico), en presencia de nitrito sódico en medio HCl, y se ancla electroquímicamente a la superficie de los electrodos mediante un proceso de “electrografting” en una sola etapa, realizando barridos sucesivos mediante voltamperometría cíclica. Una vez modificado, el material electródico puede funcionalizarse y posteriormente unir covalentemente los biorreactivos necesarios para la detección.

Esta estrategia ha sido utilizada para la realización de estudios fundamentales sobre electrodos de carbono [Saby, 1997; Verma, 2011], y en la preparación de monocapas mixtas para el estudio de la electroquímica de proteínas [Liu, 2006]. Durante los últimos años ha cobrado relevancia, ya que además de ser una alternativa fácil de implementar, genera enlaces más fuertes entre el sustrato y las moléculas injertadas que los obtenidos por las otras metodologías. Como ejemplos de su aplicación a la preparación de inmunosensores, en la Tabla 2 se han resumido algunos de los métodos descritos en la bibliografía.

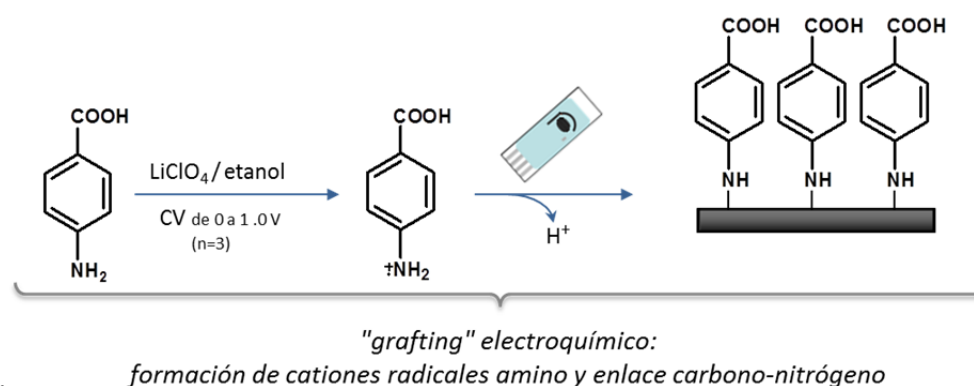
Cabe citar el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la determinación de adrenocorticotropina (ACTH) [Moreno-Guzmán, 2012BB] y de otra configuración dual para la determinación simultánea de esta proteína y cortisol [Moreno-Guzmán, 2012E]. En estos diseños, una vez injertado el radical a la superficie de los electrodos serigrafados de carbono, se incorporó al mismo el ácido aminofenilborónico mediante unión covalente. La preparación de electrodos modificados con un ácido borónico tiene, como se ha señalado, la ventaja de que,

debido a su afinidad por los azúcares, este grupo interacciona con la unidad carbohidratada de los anticuerpos situada en la región constante Fc, de forma que éstos quedan inmovilizados sobre la superficie electródica de manera orientada, mejorando así la eficiencia de la reacción con el antígeno **[Moreno-Guzmán, 2012E]**. Radi y col. desarrollan un inmunosensor impedimétrico sin marcador para la determinación de ocratoxina A empleando esta estrategia de modificación electródica, e inmovilización covalente del anticuerpo por el método de la carbodiimida. La reacción de afinidad entre la ocratoxina A y el anticuerpo de la superficie electródica se monitoriza mediante espectroscopia de impedancia electroquímica, encontrándose una proporcionalidad directa entre el aumento de la resistencia a la transferencia de carga y la concentración de la toxina **[Radi, 2009]**.

Hayat y col. desarrollaron un inmunosensor para la determinación de ácido ocaído (OA), inmovilizando el analito sobre un electrodo serigrafiado de carbono modificado por grafting de la sal de diazonio del ácido 4-aminofenilborónico seguido de la unión covalente de hexametildiamina. De este modo, el analito puede inmovilizarse también covalentemente sobre el conjunto y desarrollar un esquema competitivo indirecto para la determinación de OA en mejillones **[Hayat, 2011T]**.

Como puede observarse en el ejemplo incluido en la Tabla 2, este método de “grafting” también se ha aplicado a superficies electródicas modificadas con nanomateriales de carbono. En este caso, Eissa y col. prepararon un inmunosensor voltamperométrico para la determinación de  $\beta$ -lactoglobulina empleando SPCEs modificados con grafeno. Una vez generado el catión 4-nitrofenil diazonio, se redujo el grupo nitro a amina, activando con glutaraldehído para inmovilizar el anticuerpo específico. La determinación se realizó por medida de la disminución de la respuesta de reducción del ferricianuro en presencia de concentraciones crecientes del alérgeno **[Eissa, 2012]**.

La segunda estrategia seguida para la preparación de estas superficies implica la oxidación electroquímica de compuestos aromáticos aminados sobre el electrodo de carbono, dando lugar a la formación del catión radical amino y posterior unión a la superficie del electrodo a través del enlace carbono-nitrógeno (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema de reacción de la oxidación electroquímica de aminas

Como se observa en el esquema, la oxidación se realiza mediante voltamperometría cíclica en medio etanol, en presencia de perclorato de litio.

Esta última estrategia ha sido empleada para preparar electrodos de carbono vitrificado modificados con multicapas de hexacianoferrato [Yang, 2006], con 4-clorometilfenilo y ácido D-glucosamídico [Gautier, 2009], con ácido sulfanílico y nanopartículas de oro [Lin, 2009], así como con  $\alpha$ -alanina para la separación voltamperométrica de dopamina y ácido ascórbico [Zhang, 2001] o con enzimas glicosiladas para la preparación de biosensores [Ma, 2005]. En relación a la construcción de inmunosensores (Tabla 2), en nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un inmunosensor de tipo competitivo para la determinación de sulfonamidas en leche inmovilizando covalentemente el anticuerpo sobre un electrodo modificado con una monocapa de 4-aminobenzoico. El límite de detección en la muestra es más de dos órdenes de magnitud inferior al límite máximo permitido de sulfonamidas totales en leche [Conzuelo, 2012]. En otro ejemplo, se lleva a cabo la electropolimerización de ácido *o*-aminobenzoico sobre un electrodo de carbono vitrificado y posteriormente se inmoviliza covalentemente el anticuerpo de la troponina T. Tras una etapa de bloqueo con etanolamina se lleva a cabo el inmunoensayo de tipo sándwich empleando un anticuerpo de detección marcado con peroxidasa. El inmunosensor es muy reproducible y presenta la sensibilidad suficiente para determinar troponina T a los niveles clínicos de utilidad en el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares [Matto, 2013]. Esta última estrategia de modificación de la superficie electródica ha sido empleada por el grupo de Zhang en la preparación de un inmunosensor de tipo sándwich para la detección del antígeno

carcinoembriónico, un conocido marcador tumoral. Estos autores emplean un método de amplificación de la señal usando nanopartículas de oro conjugadas con el anticuerpo de detección marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La amplificación de la señal se debe, por una parte, a la presencia de múltiples moléculas del anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina sobre las nanopartículas de oro y, por otro, a la presencia en la disolución de la enzima diaforasa que cataliza la reducción de la quinona, formada por oxidación electroquímica sobre el electrodo del *p*-aminofenol, producto de la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina. De esta forma se regenera *p*-aminofenol que es oxidado nuevamente sobre el electrodo [Zhang, 2011].

Tabla 2. Inmunosensores basados en la modificación electrodródica mediante la técnica de grafting.

Método grafting	Tipo de inmunoensayo	Procedimiento	Técnica	Análito/muestra	Características analíticas	Ref.
Reducción de sales de diazonio	Directo sin marcador	Ocratoxina A/Ab/pABA/Au	EIS 5mV $10^4-10^2$ Hz	Ocratoxina A / suero	IL: 1–20 ng/mL LD: 0.5 ng/mL	Radi, 2009
Reducción de sales de diazonio	Competitivo indirecto	AP-anti-IgG/anti-AO/OA/HMDA/pABA /SPCE	DPV 0.1 a 0.4 V	AO / extractos de mejillón	IL: 1–5000 ng/mL LD: 1.44 pg/mL	Hayat, 2011T
Reducción de sales de diazonio	Competitivo directo	AP-Strept/biotin-ACTH + ACTH/Ab/APBA/pABA/SPdCE	DPV -0.15 a 0.60	ACTH / suero	IL: 0.025–1 pg/mL LD: 18 pg/L	Moreno-Guzmán, 2012BB
Reducción de sales de diazonio	Competitivo directo	AP-Strept/ACTH-biotin + ACTH/Ab/APBA/pABA/SPdCE AP-Cortisol + cortisol/Ab/APBA/pABA/SPdCE Sustrato: naftilfosfato	DPV -0.15 a 0.60 V	ACTH y cortisol / suero	IL: 0.05–100 pg/mL (ACTH) IL: 0.1–500 ng/mL (cortisol) LD: 4 fg/mL (ACTH) LD: 37 pg/mL (cortisol)	Moreno-Guzmán, 2012E
Reducción de sales de diazonio	Directo sin marcador	$\beta$ -LG/Ab/GA/pAP/GSPCE	DPV -0.3 a 0.4 V	$\beta$ -LG / comida	ID: 0.001–100 ng/mL LD: 0.85 pg/mL	Eissa, 2012
Oxidación de aminas	Competitivo directo	HRP-SPY + SPY/Ab/pABA/SPdCE Mediador: HQ	Amperometría E = -0.20 V	SPY / leche	IL: 1.6–118.6 ng/mL LD: 0.44 ng/mL	Conzuelo, 2012
Oxidación de aminas	Sándwich	HRP-Ab/cTnT/Ab/oABA/GCE Mediador: HQ	Amperometría E = -0.05 V	cTnT / suero	IL: 0.5 - 5 ng/mL LD: 0.16 ng/mL	Mattos, 2013
Oxidación de aminas	Sándwich	AP-Ab/MiGg/Ab/oABA/BDD Sustrato: AAP	Amperometría E = -0.4 V	MiGg / suero	IL: 1 - 1000 ng/mL LD: 0.3 ng/mL	Preechaworapun, 2008
Oxidación de aminas	Directo	HlgG/Ab/mABA/Au	SPR	HlgG	IL: 1 - 10 $\mu$ g/mL	Sriwichai, 2010
Oxidación de aminas	Sándwich	AuNPs-AP-Ab/CEA/Ab/oABA/GCE	CV: -0.2 V a 0.3 V 10 mV/s	CEA	IL: 0.005 - 50 ng/mL LD: 2 pg/mL	Zhang, 2011

**AP:** fofatasa alcalina; **APBA:** ácido aminofenilborónico; **ACTH:** hormona adrenocorticotropina; **AP:** fosfatasa alcalina; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **BDD:** electrodo de diamante dopado con boro; **CEA:** antígeno carcinoembrionario; **cTnT:** troponina T; **CV:** voltamperometría cíclica; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **GA:** glutaraldehído; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **GSPCE:** electrodo serigrafado de carbono modificado con grafeno; **HlgG:** anti-IgG humana; **HMDA:** hexametildiamina; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa de rábano; **ID:** intervalo dinámico; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **mABA:** ácido *m*-aminobenzoico; **MigG:** anticuerpo de ratón; **OA:** ácido ocaico; **pAP:** *p*-aminofenil; **pABA:** ácido *p*-aminobenzoico; **oABA:** ácido *o*-aminobenzoico; **SPdCE:** electrodo serigrafado dual de carbono; **SPCE:** electrodo serigrafado de carbono; **SPR:** resonancia de plasmón superficial; **SPY:** sulfapiridina; **Strept:** estreptavidina; **TTF:** tetratrafalvaleno

### 3.5.2. Nanomateriales empleados para la modificación de la superficie electródica

En el diseño de un inmunosensor electroquímico, la superficie electródica juega un papel decisivo. Como se ha señalado, ésta debe ser a la vez adecuada para la inmovilización estable y eficaz de un elevado número de biomoléculas, y para proporcionar respuestas adecuadas sensibles y reproducibles. En este trabajo se han utilizado electrodos serigrafiados de carbono como plataformas electroquímicas, tanto para la preparación de los magnetoinmunosensores antes descritos, como para la inmovilización directa de los inmunorreactivos. Además, con el fin de mejorar sus características, la superficie activa de estos electrodos se modificó con nanomateriales de carbono. Como es sabido, la nanoestructuración electródica proporciona algunas ventajas generales en relación a la respuesta electroquímica, derivadas de las características del nanomaterial empleado. Éstas se ponen de manifiesto al observar un aumento de la magnitud de la respuesta electroquímica, así como efectos electrocatalíticos hacia algunos procesos electroquímicos, y una menor tendencia al ensuciamiento del electrodo modificado. Por otro lado, como se verá, el empleo de estrategias de funcionalización apropiadas hace posible la transformación de estos materiales en medios activos para la inmovilización de biomoléculas. Hay que decir que, como es sabido, la escasa solubilidad de los nanomateriales de carbono en los disolventes habituales y la dificultad de preparación de suspensiones estables de los mismos, es uno de los problemas principales que conlleva su empleo, y que ha complicado su aplicación a la preparación de biosensores [Vairavapandian, 2008]. Sin embargo, mediante tratamiento químico con reactivos oxidantes, se produce su rotura y acortamiento (en el caso de los nanotubos), y se crean grupos hidroxilo o carboxilo superficiales, mejorando su dispersabilidad y su interacción con las moléculas biológicas.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado, tres tipos de nanomateriales: nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), de pared doble (DWCNTs), y nanocuernos de carbono (CNHs). A continuación se describen sus características y se revisan algunas de sus aplicaciones para la preparación de inmunosensores electroquímicos.

### 3.5.2.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs)

Los nanotubos de carbono (CNTs) se han venido utilizando desde hace más de una década para la preparación de superficies electródicas útiles para su empleo como sensores y biosensores electroquímicos [Agüí, 2008; Jacobs, 2010]. En estas aplicaciones se han aprovechado las características únicas de este material, principalmente su elevada conductividad y su resistencia mecánica, así como su capacidad para mejorar la reacción de transferencia electrónica, aumentando la velocidad del proceso y disminuyendo el tiempo de respuesta. Dentro del campo de los biosensores, es muy alto el número de dispositivos enzimáticos basados en CNTs desarrollados hasta la fecha pero, comparativamente, el número de inmunosensores es mucho menor. Posiblemente, esto es debido a que la inmovilización de anticuerpos requiere un control preciso de su orientación.

Como ejemplos de algunas de las configuraciones desarrolladas, en la Tabla 3 se resumen las características analíticas de algunos inmunosensores basados en el empleo de electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple.

Como puede apreciarse, se han utilizado diversas estrategias para lograr la inmovilización adecuada de la biomolécula sobre la superficie electródica. La alternativa más sencilla consiste en emplear electrodos metálicos o de carbono modificados con nanotubos de carbono previamente oxidados por tratamiento con ácidos fuertes. Así, los grupos carboxilo generados en la superficie de este material, pueden ser aprovechados para enlazar covalentemente la proteína de interés. Este procedimiento fue empleado, por ejemplo, para la preparación de varias configuraciones para la determinación de clenbuterol en alimentos [He, 2009] y en orina de animales [Liu, 2011]. En el primero, se diseñó un inmunoensayo competitivo indirecto sin marcador, empleando un electrodo modificado con una suspensión de MWCNTs-clenbuterol. Tras la puesta en contacto del electrodo modificado en una mezcla de anti-clenbuterol y clenbuterol libre, se realizó la medida electroquímica de una disolución de ferricianuro mediante voltamperometría diferencial de impulsos [He, 2009]. La configuración desarrollada por Liu y col. se basó en la inmovilización de anti-clenbuterol sobre un SPCE modificado con el conjugado MWCNT-IgG, capaz de interactuar con el anti-clenbuterol producido en ratón. Se estableció un esquema de

inmunoensayo competitivo entre el conjugado HRP-clembuterol y el analito por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado, y se midió la respuesta electroquímica del peróxido de hidrógeno en presencia de TMB [Liu, 2011].

También se desarrolló un inmunosensor para la determinación simultánea de las bacterias *E. coli*, *Campylobacter* y *Salmonella*. Se inmovilizaron covalentemente los tres anticuerpos específicos sobre un SPCE modificado con MWCNTs funcionalizados con polialilamina, estableciéndose un inmunoensayo tipo sándwich con anticuerpos de detección conjugados a nanocristales de CdS, PbS y CuS para cada microorganismo, respectivamente. La medida mediante voltamperometría de onda cuadrada de redisolución anódica (SWASV) de la concentración de los diferentes iones metálicos liberados, permitió la obtención de calibrados lineales para las tres bacterias entre  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^5$  células/mL, siendo los límites de detección de 400, 400 y 800 células/mL para *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli*, respectivamente [Viswanathan, 2012].

**Tabla 3.** *Inmunosensores electroquímicos basados en nanotubos de carbono de pared múltiple.*

Electrodo	Tipo de inmunoensayo	Procedimiento	Detección	Análito / Muestra	Características analíticas	Ref.
MWCNTs/GCE	Competitivo indirecto sin marcador	GCE modif. con MWCNTs-clemb; incub. en anti-clemb +clemb	CV y DPV con [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup>	Clembuterol / alimentos para animales	IL: 0.8 - 1000 ng/mL LD: 0.32 ng/mL	He, 2009
Chit/AuNPs/ MWCNTs/GCE	Directo sin marcador	Inmov. de anti-CEA sobre GCE modificado con CNTs-AuNPs-Chit; form. de inmunocomplejo	EIS, CV y DPV con [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup>	Antígeno carcinoembrionario (CEA)	IL: 0.3 - 2.5 y 2.5 - 20 ng/mL LD: 0.01 ng/mL	Huang, 2010
GNPs/MnO <sub>2</sub> /Chit/Ag/ MWCNTs/GCE	Directo sin marcador	GCE modif. con CNTs-AgNPs y con Chit-MnO <sub>2</sub> ; electrodep. de AuNPs; inmov. de anti-AFP; form. de inmunocomplejo	EIS y CV con [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup>	α-fetoproteína (AFP) / suero	IL: 0.25 - 250 ng/mL LD: 0.08 ng/mL	Che, 2010
MWCNTs PE	Sándwich	Inmov. de anti-ricina sobre MWCNTs PE; form. de inmunocomplejo; inmersión en AP-anti-ricina	Amperometría con 1-naftol	Ricina / agua	IL: 0.625-25 ng/mL LD: 562 pg/mL	Suresh, 2010
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /MWCNTs/AuE	Sándwich	Funcionalización de MWCNTs; electrodep. de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; inmov. cov. de anti-tlgG; inmov. magnética a AuE; incub. en tlgG; incub. en HRP-anti-tlgG	CV con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Antígeno de tétanos humano	IL: 30 - 1000 ng/mL LD: 25 ng/mL	Zarei, 2012
Thi/[BMIM]PF <sub>6</sub> / MWCNTs/SPCE	Directo con marcador	SPCE modif. con susp. de MWCNTs-[BMIM]PF <sub>6</sub> -NaDDBS; inmers. en Thi; inmov. de HRP-anti- <i>E.sakazakii</i> y form. de inmunocomplejo	CV con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	IL: 103 - 109 CFU/mL LD: 77 CFU/mL	Zhang, 2012
AuNPs/MWCNTs/AuE	Sándwich	Modif. AuE con AuNPs/ MWCNTs carboxilados; adic. de avidina; inmers. en biotin-anti-AFP; incub. en AFP; inmers. en biotin-anti-AFP; inmers. en HRP-avidina- PtNPs; inmers. en HRP-biotin	CV con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	α-fetoproteína (AFP) / suero	IL: 0.25 - 100 ng/mL LD: 0.08 ng/mL	Hong, 2012

**Tabla 3.** Inmunosensores electroquímicos basados en nanotubos de carbono de pared múltiple (continuación).

Electrodo	Tipo de inmunoensayo	Procedimiento	Detección	Análito/muestra	Características analíticas	Ref.
MWCNTs/SPCE	Competitivo directo	Modif. de SPCE con MWCNTs-anti-IgG; inmov. de anti-clemb; inmers. en HRP-clemb + muestra	Amperometría con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Clembuterol / orina de cerdo	IL: 0-10 ng/mL LD: 0.1 ng/mL	Liu, 2011
poli(L-arginina)-AuNPs/MWCNTs/GCE	Directo sin marcador	Modif. de GCE con MWCNTs; electrodep. de L-arginina + AuNPs; inmov. de anti-CS; form. de inmunocomplejo	CV y DPV con [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup>	Caseína (CS) / queso	IL: 0.1 -10 µg/mL LD: 0.05 µg/mL	Cao, 2011
PS/MWCNTs/AuE	Sándwich	Adic. de MWCNTs modif. con PS sobre AuE; inmov. cov. del Ag; form. del inmunocomplejo; inmers. en HRP-anti-hIgG o HRP-anti-rIgG	Amperometría con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Anticuerpos de artritis reumatoide / suero humano o de conejo	–	De García Villa, 2011
PAH/MWCNTs/SPCE	Sándwich	Unión cov. de MWCNTs carboxilados a anti-E.coli, anti-campy y anti-salm con CuS, PbS y CdS; depos. sobre SPCE con PAH; inmov. Abs con GA sobre MWCNTs; incub. en muestra; incub. en NC-bioconjugados; adic. de Hg <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> para liberar los metales	SWASV / Cd <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i> / leche	IL: 1·10 <sup>3</sup> - 5·10 <sup>5</sup> células/mL <i>E.Coli</i> 800 cél/mL LD: <i>Campy.</i> 400 cél/mL <i>Salmon.</i> 400 cél/mL	Viswanathan, 2012

**Abreviaturas:** adic.: adición; **AFP:** α-fetoproteína; **AP:** fosfatasa alcalina; **AuE:** electrodo de oro; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **[BMIM]PF<sub>6</sub>**:

hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (líquido iónico); **Chit:** quitosán; clemb.: covalente; **CS:** caseína; **CV:** voltamperometría cíclica; **DPV:**

voltamperometría diferencial de impulsos; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **electrodep.:** electrodeposición; **form.:** formación; **GCE:**

electrodo de carbono vitrificado; **hIgG:** anticuerpos de artritis reumatoide de humano; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IL:** intervalo lineal; **incub.:**

incubación; **inmers.:** inmersión; **inmov.:** inmovilización; **LD:** límite de detección; **modif.:** modificación; **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple;

**MWCNTPE:** electrodo de pasta de nanotubos de carbono; **NaDDBS:** dodecil benceno sulfonato sódico; **nAg:** nanopartículas de plata; **NC:** nanocrystal; **PAH:**

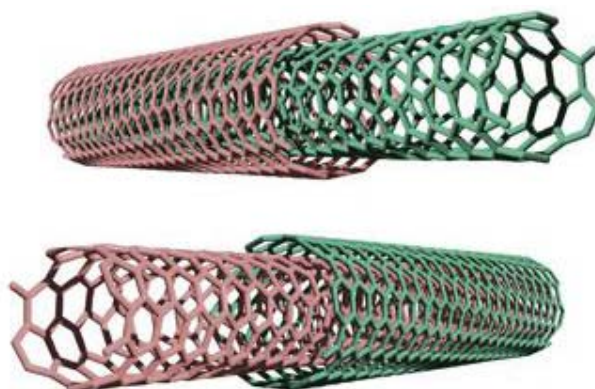
polialilamina; **PS:** poliestireno; **PtNPs-avidina-HRP:** nanopartículas de Pt funcionalizadas con avidina y HRP; **rIgG:** anticuerpos de artritis reumatoide de

conejo; **SPCE:** electrodo serigrafado de carbono; **SWASV:** voltamperometría de onda cuadrada de redisolución anódica; **Thi:** tiónina; **tIgG:** antígeno de

tétanos humano IgG

### 3.5.2.2. Nanotubos de carbono de pared doble (DWCNTs)

Los nanotubos de carbono de pared doble (DWCNTs) están formados por dos capas cilíndricas y concéntricas de grafeno, siendo por tanto los nanotubos de pared múltiple más sencillos. Sus propiedades conductoras y elevada resistencia química y mecánica han atraído el interés por su uso en la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares [Wu, 2012]. Estos nanotubos han sido investigados en profundidad con el fin de dilucidar la influencia de su estructura en sus características electrónicas que, se sabe, dependen sensiblemente de la relación quiral y diámetro de los cilindros coaxiales (Figura 10). De este modo, atendiendo a estas diferencias, se han descrito varios tipos de DWCNTs con un comportamiento doblemente semiconductor (S/S) o metálico (M/M), y de propiedades intermedias (M/S) ó (S/M) [Liu, 2009ACS].



**Figura 10.** Estructura de los DWCNTs donde se observa la quiralidad de los cilindros.

Los nanotubos de carbono de pared doble se consideran desde hace poco tiempo una mejor alternativa para la preparación de sensores electroquímicos que sus análogos, los de pared simple (SWCNT) empleados tradicionalmente [Moore, 2011]. Una razón importante es que los DWCNTs pueden funcionalizarse selectivamente, introduciendo grupos en la pared externa sin alterar el cilindro interno que conserva las propiedades electrónicas de este nanomaterial. Sin embargo, en el caso de los SWCNTs, la funcionalización romperá algunos dobles enlaces C=C, dejando "agujeros" en la estructura del nanotubo y, por lo tanto, modificando sus propiedades eléctricas y mecánicas. Así, se ha encontrado que los electrodos modificados con DWCNTs poseen un mejor comportamiento electroquímico que los modificados con SWCNTs,

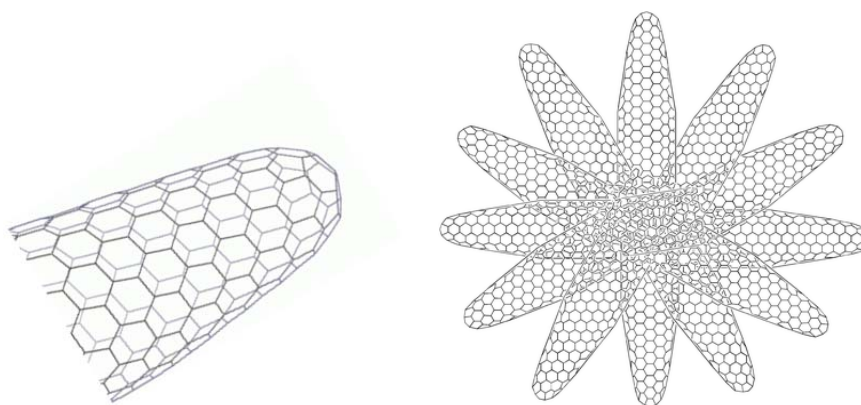
proporcionando una transferencia electrónica más rápida, con efectos electrocatalíticos para varias especies [Pumera, 2007NRL].

A pesar de sus excelentes propiedades electroquímicas, se han encontrado muy pocos ejemplos en la literatura de plataformas sensoras basadas en el empleo de DWCNTs. Como ejemplo, cabe destacar un biosensor enzimático para xantina utilizando un electrodo de pasta de carbono modificado con DWCNTs [Anik, 2009]. Otro ejemplo, basado en una configuración similar, es la preparación de un biosensor de glucosa en el que la enzima glucosa oxidasa se adsorbe sobre un electrodo de carbono vitrificado modificado con DWCNTs oxidados [Pumera, 2007JNN].

En relación a la preparación de inmunosensores, en la bibliografía consultada, únicamente se ha encontrado una configuración basada en el empleo de DWCNTs. En ella se inmovilizaba covalentemente el anticuerpo de la bacteria *Salmonella typhimurium* sobre los nanotubos carboxilados, diseñándose un esquema de detección sin marcador [Punbusayakul, 2013].

### 3.5.2.3. Nanocuernos de Carbono (CNHs)

Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono, han sido muchos los esfuerzos realizados por los investigadores orientados a la síntesis y caracterización de nuevas nanoestructuras de carbono. Entre ellas, cabe destacar los nanocuernos de carbono, que consisten en láminas de grafeno de pared única arrolladas sobre sí mismas dando lugar a formas cónicas (ver Figura 11). El hecho de que aparezcan estas formas, en lugar de los cilindros habituales se debe a la presencia de cinco pentágonos en sus extremos, que originan un vértice con una abertura de ángulo de  $20^\circ$ . El resto de su estructura se compone de un entramado de hexágonos similares a los existentes en una lámina de grafeno. Los nanocuernos de carbono presentan una longitud aproximada de 40 a 50 nm, con un diámetro creciente que va desde 1-2 nm en el vértice a 4-5 nm en su extremo más ancho.



**Figura 11.** Estructura de los CNHs y los agregados en forma de dalia.

Una particularidad de los nanocuernos de carbono es que se obtienen por ablación láser de grafito puro en ausencia de catalizadores metálicos [Iijima, 1999]. Por eso, no solo la distinta estructura, sino también la elevada pureza de este nanomaterial ha promovido el interés en su uso para varias aplicaciones [Yudasaka, 2008; Zhu, 2010]. Los CNHs tienden a formar agregados cuasi esféricos, en forma de dalias (Ver Figura 11) con una alta concentración de defectos y gran área superficial. Los tratamientos de oxidación conducen a la formación de restos carboxílicos, principalmente en las puntas de los conos, que pueden ser empleados para la fijación covalente de moléculas orgánicas [Zhang, 2007; Pagona, 2006].

En la bibliografía se han encontrado configuraciones de biosensores electroquímicos basadas en electrodos modificados con CNHs que muestran transferencia electroquímica directa de las proteínas. Por ejemplo, la inmovilización de glucosa oxidasa (GOx) sobre una película de nafión-CNHs da lugar a voltamperogramas cíclicos con un par de picos redox a un potencial medio de -0.453V. Empleando esta configuración se preparó un biosensor para la determinación de glucosa en un intervalo lineal desde 0 a 6 mM con ácido ferroceno-monocarboxílico como mediador redox [Liu, 2008]. Más recientemente, los mismos autores prepararon una película de CNHs funcionalizados de forma no covalente con poli(4-estirenosulfonato de sodio) para la inmovilización de mioglobina, y desarrollaron un biosensor electroquímico que muestra transferencia electrónica directa y actividad electrocatalítica para la reducción del peróxido de hidrógeno [Liu, 2010a]. También se ha observado transferencia electrónica directa de la peroxidasa de soja (SBP) adsorbida sobre electrodos modificados con CNHs, así como electrocatalisis efectiva para reducción de  $H_2O_2$  [Shi,

**2009]**. Otro grupo de investigación desarrolló un biosensor basado en la inmovilización de híbridos de nanopartículas de oro/CNHs y xantina oxidasa en un electrodo de platino para la detección de hipoxantina y xantina en pescados **[Zhang, 2009]**.

En relación al uso de CNHs para la preparación de inmunosensores electroquímicos, se han encontrado muy pocas configuraciones en la bibliografía consultada. La primera de ellas, para la determinación de microcistina-LR (MC-LR), se basa en un formato de inmunoensayo competitivo indirecto que implica la inmovilización covalente del antígeno a CNHs oxidados y el uso del anticuerpo MC-LR marcado con peroxidasa **[Zhang, 2010]**. Más recientemente, se ha descrito un inmunosensor de tipo sándwich para la detección impedimétrica de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) basado en la unión de las enzimas HRP y GOx a los CNHs y la formación, sobre la superficie del electrodo, de un compuesto insoluble resultante de la oxidación catalítica del sustrato 4-cloro-1-naftol por peróxido de hidrógeno. Esta configuración condujo a una mejora significativa de la señal de la pareja redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  **[Yang, 2014]**.

También se han utilizado los CNHs como medios de amplificación de las señales analíticas en estos sistemas. Se ha desarrollado un inmunosensor multiplex para la determinación de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) y antígeno carcinoembrionario (CEA) basado en la inmovilización de los anticuerpos de captura específicos sobre un SPCE dual. Una vez formados los inmunocomplejos con los antígenos correspondientes, se prepararon dos esquemas de tipo sándwich empleando anticuerpos de detección biotinilados que se hicieron interaccionar con conjugados Strept/AuNPs/CNHs. La deposición de plata sobre los mismos, permitió obtener una notable amplificación de la señal de redisolución, alcanzándose límites de detección de 0.0024 pg/mL y 0.032 pg/mL para AFP y CEA, respectivamente **[Zhao, 2014]**. Otro ejemplo es el de un inmunosensor electroquímico para la detección de procalcitonina (PCT), un biomarcador de la septicemia, basado en la inmovilización del anticuerpo primario sobre un electrodo modificado con óxido de grafeno reducido y nanopartículas de oro, y el empleo de un esquema tipo sándwich con un anticuerpo secundario conjugado con tionina, e inmovilizado sobre de CNHs en presencia de peroxidasa y cadenas de nanopartículas de platino huecas (HPtCs). Estas cadenas poseen una actividad electrocatalítica

superior a las nanoesferas de platino convencionales y, en conjunto, todos los materiales contribuyen a la obtención de una excelente sensibilidad [Liu, 2014].

### **3.6. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS**

Una de las etapas cruciales en el diseño y desarrollo de un inmunosensor electroquímico es la inmovilización de la biomolécula sobre la superficie del transductor. La estrategia elegida debe permitir un íntimo contacto entre el elemento de reconocimiento biológico y el electrodo, manteniendo inalterable, en la medida de lo posible, la estabilidad y la actividad de la biomolécula. Además, deben emplearse preferentemente, métodos de inmovilización que garanticen la adecuada orientación de los inmunorreactivos. La necesidad de procurar estas condiciones hace que esta etapa sea determinante en el buen funcionamiento del inmunosensor y que de ella dependan su reproducibilidad, sensibilidad, selectividad y estabilidad [Tedeschi, 2003].

A continuación se revisan las alternativas que se han empleado en esta Tesis Doctoral para la preparación de las plataformas inmunosensoras que se presentan. Se han considerado las posibilidades de aplicación de cada una de ellas sobre los distintos materiales electródicos empleados, realizando además una breve descripción de las metodologías utilizadas y algunas de sus aplicaciones.

#### **3.6.1. Uniones de afinidad**

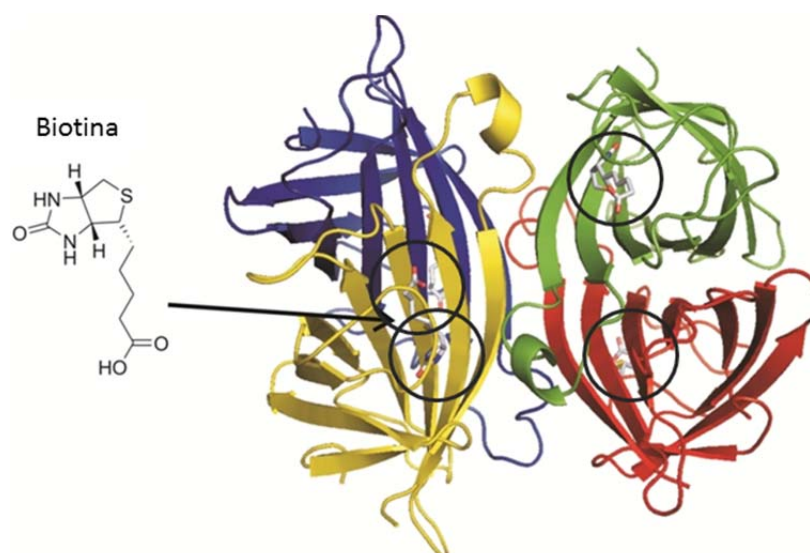
La inmovilización de biomoléculas mediante uniones de afinidad se basa mayoritariamente en las interacciones biotina-(estrept)avidina, y en las de aquéllas con las proteínas A o G. Dentro de esta categoría, otra metodología menos frecuente, empleada para la inmovilización de anticuerpos, se basa en el uso de ácido borónico por su capacidad de unión preferente a la región de carbohidratos de las glicoproteínas [Moreno-Guzmán, 2012BB]. Desde un punto de vista general, puede decirse que esta forma de inmovilización se caracteriza por proporcionar una buena orientación a los inmunorreactivos.

### 3.6.1.1 Biotina–(estrept)avidina

Como es sabido, la estreptavidina y la avidina son proteínas tetraméricas (70 kDa) que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La primera es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* mientras que la segunda es una proteína glicosilada (posee un 7% de carbohidratos) con carga positiva (pI ~ 10.5), que se aísla de la clara del huevo. La biotina (vitamina H) es una molécula pequeña con gran afinidad por los sitios de unión de estas proteínas. La interacción biotina-estreptavidina (y de forma equivalente, la biotina-avidina) representa un modelo de reconocimiento molecular [Häussling, 1991]. Por un lado, es altamente específica, con una constante de afinidad,  $K = 10^{15}$  L/mol, muy elevada. Este valor es muy próximo al del enlace covalente, por lo que sólo puede eliminarse en condiciones muy adversas. Por otro lado, aunque la biotina se funcionalice, lo cual es relativamente sencillo, las características de esta unión prácticamente no se alteran.

Debido a esta fuerte interacción, la formación del complejo tampoco se ve afectada por cambios de pH, temperaturas extremas, disolventes orgánicos o por la presencia de agentes desnaturalizantes. Hay que remarcar que la inmovilización de biomoléculas basada en la unión biotina-(estrept)avidina preserva la función biológica de las moléculas inmovilizadas con más efectividad que otras metodologías comúnmente utilizadas. Esto hace que la modificación con biotina (biotinilación) de una gran variedad de biomoléculas como proteínas, enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos, se haya convertido en una etapa aplicada con mucha frecuencia para la preparación de los inmunoconjugados.

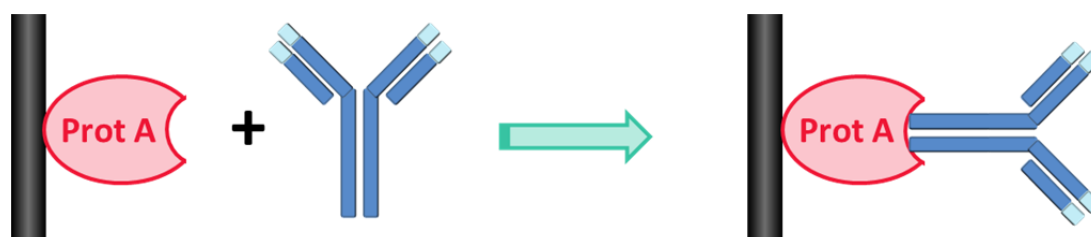
La unión tetravalente de (estrept)avidina-biotina (Figura 12) permite la construcción de sándwiches moleculares, donde la (estrept)avidina unida a una superficie puede acoplarse con los elementos de reconocimiento biotinilados. La estabilidad acuosa del complejo biotina-(estrept)avidina hace fácil el manejo de este sistema; sin embargo, la presencia de esta capa de proteína puede inducir la adsorción inespecífica y comprometer la sensibilidad y selectividad del biosensor [Athey, 1995].



**Figura 12.** Representación esquemática de la unión tetraivalente estreptavidina –biotina.

### 3.6.1.2. Proteína A–anticuerpo

Este tipo de interacción es uno de los mejor estudiados. La proteína A es un polipéptido de 42 kDa constituyente habitual de la pared del *Staphylococcus aureus* que tiene cuatro lugares de unión potenciales a los anticuerpos y es bifuncional, permitiendo la formación de complejos multiméricos con las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada del anticuerpo. La unión implica la formación de un conjunto de enlaces no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals entre los aminoácidos de la región  $F_c$  y la proteína A (Figura 13). Este tipo de interacciones, aunque de manera individual son débiles, en conjunto tienen una energía de unión que equivale o supera a un enlace de naturaleza covalente [Rao, 1998]. Por otro lado, la unión de los anticuerpos a estos receptores  $F_c$  permite dejar libres los sitios de unión al antígeno, eliminándose así los inconvenientes de la orientación al azar de los anticuerpos sobre los soportes sólidos [Lu, 1996].



**Figura 13.** Representación esquemática de la inmovilización orientada de anticuerpos a través de la unión de afinidad con proteína A.

Por otro lado, la proteína G, de características similares a la proteína A, es un polipéptido de entre 30 y 35 kDa aislada de la pared del *Streptococcus* beta-hemolítico de las cepas C o G, capaz de unirse también a la fracción Fc de los anticuerpos. La proteína G difiere de la proteína A en su capacidad de reconocimiento de anticuerpos. Así, puede reconocer las cuatro clases de IgG incluyendo la IgG3 pero no posee capacidad de unión a las IgM e IgA. Uno de los inconvenientes de la proteína G es que presenta un segundo lugar de unión a la albúmina. Actualmente mediante métodos recombinantes se ha eliminado ese segundo lugar de unión lo que ha supuesto un incremento de la utilidad de la proteína G [Honegger, 2005; Jung, 2007].

En la Tabla 4 se muestra la afinidad de las proteínas A y G por las distintas clases de inmunoglobulinas en base a la cual se ha elegido la funcionalización de las partículas magnéticas empleadas en el magnetoinmunosensor de la ceruloplasmina.

**Tabla 4.** Afinidad de enlace de las proteínas A y G por las diferentes especies y subclases de inmunoglobulinas [Honegger, 2005; Interchim, 2007; Life Tech. Corp., 2013].

Especie	Inmunoglobulina y subclase	Proteína A	Proteína G
Humano	IgG1, IgG2, IgG4	++++	++++
	IgG3	-	+++
Ratón	IgG1	+	+++
	IgG2a, IgG2b, IgG3	+++	+++
Rata	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
Cabra	IgG2c	+	++
	IgG1	+	+++
	IgG2	+++	+++
Oveja	IgG1	+	++
	IgG2	+++	+++
Vaca	IgG1	+	+++
	IgG2	+++	+++
Caballo	IgG total	++	++++
Conejo	IgG total	+++	+++
Perro	Ig total	++	+
Gato	IgG total	+++	+
Cerdo	Ig total	+++	++
Cobaya	Ig total	++++	++
Pollo	IgY	-	-

++++, afinidad muy elevada; +++, afinidad elevada; ++, afinidad media; + afinidad débil; -, sin afinidad.

### 3.6.2. Unión covalente

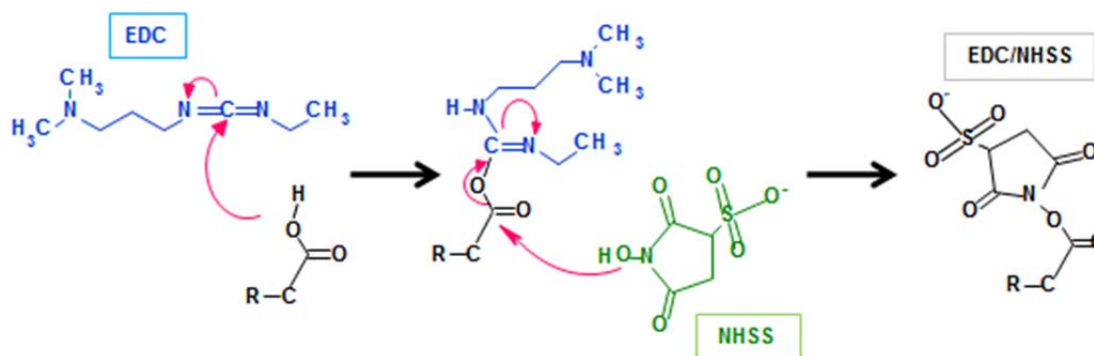
La inmovilización covalente de proteínas sobre la superficie del transductor presenta ventajas muy atractivas para la preparación de inmunosensores electroquímicos, ya que proporciona una buena estabilidad de la biomoléculas, con baja pérdida de actividad. Generalmente, el enlace se establece a través de los numerosos grupos amino ( $-NH_2$ ) existentes, tanto en los extremos de las cadenas polipeptídicas que componen la proteína, como en los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, aminoácido muy abundante en la mayoría de las proteínas [Hernández, 2011]. Estos grupos  $\epsilon$ -amino generalmente se disponen en la superficie exterior de las proteínas, estando accesibles para su anclaje a la superficie electródica sin que la estructura proteica sufra desnaturalización. En condiciones de pH ligeramente ácido o neutro, los grupos  $\epsilon$ -amino se encuentran cargados positivamente.

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de este tipo de inmovilización, es su carácter no orientado, lo cual en ocasiones impide el acceso a la zona de reconocimiento antigénica de los anticuerpos [Yuanyuan, 2006].

En esta Tesis Doctoral, la unión covalente de biomoléculas se ha llevado a cabo sobre superficies provistas de grupos carboxilo. Estas funciones pueden aprovecharse para la formación de enlaces de tipo amida con los grupos amino de las biomoléculas. Sin embargo, es necesario intercalar una etapa de activación previa, que se ha implementado mediante el sistema de la carbodiimida, usando disoluciones que contenían una mezcla de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS) [Lahiri, 1999]. En la Figura 14 se han representado las etapas que tienen lugar y las especies intermedias que se producen. Como puede observarse, primero la EDC convierte el ácido carboxílico en un reactivo intermedio susceptible de ser atacado por aminas, con la consiguiente formación de un enlace amida de elevada estabilidad. La incorporación de NHSS da lugar a un reactivo intermedio más estable que favorece la reacción de inmovilización [Wang, 2006].

La principal ventaja de esta metodología es su relativa simplicidad, aunque hay que tener en cuenta que en las proteínas pueden existir numerosos grupos amino, lo

que además de dar lugar a la falta de orientación ya comentada, pueden introducir problemas de falta de reproducibilidad [Turková, 1999].



**Figura 14.** Esquema de reacción de un ácido carboxílico con el sistema N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) / N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS)

### 3.6.3. Unión mediante complejos metálicos

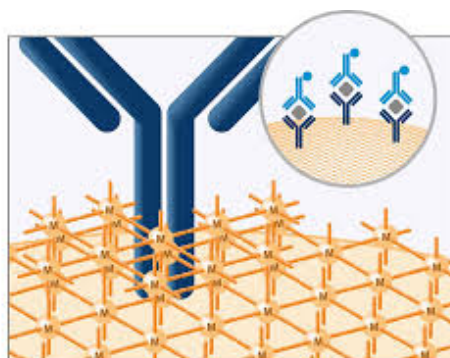
La inmovilización orientada de anticuerpos empleando complejos metálicos se conoce desde hace algunos años. Por ejemplo, Hale, en 1995 empleó un complejo de cobalto-iminodiacetato con este objetivo, observando una buena estabilidad [Hale, 1995]. Además, debido a que la posición de enlace de los anticuerpos a los metales se encuentra en el extremo C de la cadena Fc, los anticuerpos así inmovilizados poseen íntegra su capacidad de interacción con los antígenos correspondientes [Turková, 1999]. Esta metodología ha sido aplicada frecuentemente en la técnica de cromatografía de afinidad basada en la inmovilización de iones metálicos (IMAC), habiéndose observado que las uniones establecidas con las biomoléculas no eran suficientemente estables como para poder ser empleadas en un sistema de inmunoensayo [Muir, 2007].

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que es posible utilizar esta alternativa de inmovilización empleando polímeros de complejos metálicos como sistemas para la unión de anticuerpos. Para llegar a esta conclusión, se ensayó una variedad de iones metálicos en presencia de diferentes ligandos, investigando su eficiencia para la enlazar IgG [Muir, 2007]. Entre otros, los complejos de Cr(III) con ácido iminodiacético y con ácido oxálico demostraron una buena capacidad de enlace.

En la actualidad, sin duda basado en estas investigaciones, se ha comercializado un reactivo enlazante, denominado Mix&Go, que es un oligómero de complejos

metálicos, probablemente de cromo, por el color de sus disoluciones, entre otros posibles iones metálicos. Empleando este reactivo, la captura orientada del anticuerpo se produce gracias a la combinación de dos efectos. En primer lugar, existe un número elevado de complejos metálicos que pueden interaccionan preferentemente con los dominios Fc [Wu, 2008; Muir, 2007]. Hay que tener en cuenta además, que las interacciones de los complejos metálicos con los anticuerpos son también múltiples, ya que la afinidad entre ellos viene determinada por la presencia de aminoácidos como la histidina, el triptófano y la cisteína. Por tanto es razonable asumir que existirán varias interacciones con cada molécula de anticuerpo. Por otro lado, el reactivo contiene pequeñas moléculas dispuestas de modo que mimetizan los dominios de unión de las proteínas A y G, facilitando la inmovilización del anticuerpo a través de la región Fc.

La capacidad enlazante del reactivo Mix&Go se extiende también a las superficies de inmovilización de los anticuerpos. Esto es debido a que los complejos metálicos presentes en la matriz polimérica pueden interaccionar con grupos dadores de electrones presentes en dichas superficies. Este sería el caso de las plataformas de nanotubos de carbono carboxilados utilizadas en esta Tesis Doctoral. Por lo anteriormente expuesto, el reactivo Mix&Go puede ser considerado un "pegamento molecular" [Ooi, 2014].



**Figura 15.** Esquema de la inmovilización de anticuerpos sobre el reactivo Mix&Go

## 3.7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE LA OBESIDAD

### 3.7.1. Leptina

Los métodos analíticos encontrados en la bibliografía para la determinación de leptina se basan generalmente en la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas [Muruzabal, 2002; Richards, 2000; Richards, 1998], ensayos inmunofuncionales [Kratzsch, 2002], radioinmunoensayos [Ryokkynen, 2003; Yan, 2002; Horn, 1996; Shi, 2006], así como de metodologías tipo ELISA [Theriault, 2001]. Estos métodos presentan algunos inconvenientes ya que generalmente se trata de métodos costosos y tediosos, que conllevan un prolongado tiempo de análisis y un elevado consumo de reactivos. En la Tabla 5 se muestran algunos de los métodos de inmunoensayo más representativos, disponibles en forma de “kits” comerciales, incluyendo información acerca de la metodología empleada, intervalo de concentración, límite de detección, precisión, tipo de muestra y tiempo de ensayo. Como puede observarse, destacan los métodos de inmunoensayo tipo sándwich, basados todos ellos en el uso de inmunorreactivos marcados con peroxidasa y detección colorimétrica mediante adición de peróxido de hidrógeno en presencia de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

**Tabla 5. Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayos ELISA para la determinación de leptina.**

Immunoensayo	Procedimiento	LD, ng/mL	Intervalo, ng/mL	V <sub>muestra</sub> , µL	t <sub>ensayo</sub>	RSD, %	Muestra
Millipore EZHL-80SK sandwich ELISA	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.5	0.5 - 100	25	3h 30min	2.6 - 4.6 (intra-ensayo) 2.6 - 6.2 (inter-ensayo)	Suero y plasma
R&D systems Quantikine sandwich ELISA	HRP-anti-Lep/Lep/anti-Lep	0.0078	0.0156 - 1.0	100	4h	3.0 - 3.3 (intra-ensayo) 3.5 - 5.4 (inter-ensayo)	Suero y plasma
GenWay Biotech Inc. sandwich ELISA	HRP- anti-Lep/Lep/anti-Lep	0.2	1 - 50	50	2h 30min	4.2 - 7.6 (intra-ensayo) 4.4 - 6.7 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Alpco sandwich ELISA	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.50	hasta 100	20	2h 5min	3.7 - 5.5 (intra-ensayo) 5.8 - 6.8 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Cayman Chem sandwich ELISA	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.5	1 - 50	100	2h 25min	3.0 - 7.5 (intra-ensayo) 3.2 - 9.2 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Diagnostics Autom., Inc., sandwich ELISA	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	1.0	0 - 100	15	3h 25min	6.0 - 6.9 (intra-ensayo) 8.7 - 11.5 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Invitrogen sandwich ELISA colorimetric	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	<0.035	0 - 1	100	3h 25min	3.0 - 3.8 (intra-ensayo) 3.9 - 5.3 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Assay Pro Max human leptin ELISA kit EL2001-1	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.12	0.125 - 32	50	5h	4.5 (intra-ensayo) 7.2 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Alpha diagnostic human leptin ELISA kit 0010	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.5	0 - 100	20	2h	7.4 - 12 (intra-ensayo) 8 - 9 (inter-ensayo)	Suero y plasma

**Tabla 5.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayos ELISA para la determinación de leptina (continuación).

Inmunoensayo	Procedimiento	LD, ng/mL	Intervalo, ng/mL	V <sub>muestra</sub> , µL	t <sub>ensayo</sub>	RSD, %	Muestra
Millipore human leptin ELISA kit EZHL-80SK	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.2	0.78 - 100	100	3h 10min	1.6 - 4.6 (intra-ensayo) 2.6 - 6.2 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Enzo leptin (human) ELISA kit ADI 900-028A	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.0234	0.031 - 2	100	3h	4.4 - 13.4 (intra-ensayo) 3.7 - 15.2 (inter-ensayo)	Suero y plasma
Abnova leptin (human) ELISA kit KA 0649	HRP-Strept/biotin-anti-Lep/ /Lep/anti-Lep	0.0625	0 - 4	250	2h 20min	<9 (intra-ensayo) <12 (inter-ensayo)	Suero, plasma y leche materna

**Abreviaturas:** biotin: biotina; HRP: peroxidasa de rábano; Lep: leptina; Strept: estreptavidina

Aparte de estos inmunoensayos, en la bibliografía consultada se han encontrado tres trabajos en los que se realizan algunos ensayos inmunométricos para la determinación de leptina. Uno de ellos se basa en un diseño tipo sándwich sobre un “nanoarray” dispuesto en un chip, empleando detección por microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) [Lee, 2009]. Más recientes son dos ejemplos de inmunoensayos enzimáticos con detección quimioluminiscente. El primero de ellos se basa en una configuración de tipo sándwich entre un anticuerpo policlonal de captura sobre partículas magnéticas de ferrita y un fragmento Fab marcado con fosfatasa alcalina, obteniéndose un límite de detección de 0.1 pg/mL [Sekigushi, 2011]. El segundo se basa en el empleo de un anticuerpo de detección biotinilado y hemina/G-quadruplex marcada con estreptavidina, un tipo de enzima a base de ADN artificial que presenta actividad peroxidasa y que cataliza la oxidación del peróxido de hidrógeno utilizando luminol como mediador. El límite de detección para la leptina empleando este dispositivo fue de 1.9 pg/mL [He, 2013].

En cuanto al diseño de inmunosensores, se han encontrado únicamente tres configuraciones. La primera de ellas implica el uso de electrodos de oro modificados con una monocapa de alcanotiol con un grupo tri(etilenglicol) terminal para inmovilizar covalentemente el anticuerpo de captura. El inmunoensayo tipo sándwich se establece empleando un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, registrando posteriormente la corriente de oxidación del *p*-aminofenol generado en la reacción enzimática del *p*-fenilfosfato mediante voltamperometría de onda cuadrada. De esta forma, se obtiene un intervalo lineal para la leptina entre 0.1 y 10 ng/mL y un límite de detección de 13.6 pg/mL [Nishimura, 2011]. El segundo es un inmunosensor impedimétrico libre de marcador basado en el empleo de nanopartículas de oro recubiertas de una monocapa mixta de polipirrol y polipirrol propílico para la unión covalente de proteína G que permite la inmovilización orientada del anticuerpo de captura. La monitorización del complejo anticuerpo-antígeno se lleva a cabo mediante el registro de los espectros de impedancia electroquímica, obteniéndose curvas de calibrado en un intervalo dinámico de concentración de 10 a 10<sup>5</sup> ng/mL y un límite de detección de 10 ng/mL en muestras de suero [Chen, 2010]. El último ejemplo, más reciente, se basa en la inmovilización covalente del anticuerpo de captura sobre un electrodo de carbono

vitrificado modificado con una película de nanotubos funcionalizados con quitosan (Chit). Para la detección de leptina se establece una configuración tipo sándwich, empleando anti-leptina en combinación con un anticuerpo biotinilado y estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina. La respuesta electroquímica se obtiene mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con 1-naftilfosfato como sustrato de la enzima. El intervalo lineal fue de 0.05 a 500 ng/mL y el límite de detección encontrado fue de 30 pg/mL [Dong, 2014].

### 3.6.2. Interleucina 6

En relación a los métodos de inmunoensayo existentes para la determinación de interleucina 6, en la Tabla 6 se han resumido algunos de los más representativos disponibles en forma de “kits” comerciales. Como puede observarse, la mayoría de ellos son métodos de inmunoensayo ELISA de tipo sándwich que emplean anti-IL6 como anticuerpo de captura, un anticuerpo secundario biotinilado y HRP-Strept, con peróxido de hidrógeno y TMB para detectar colorimétricamente la formación de los inmunocomplejos.

En cuanto al empleo de inmunosensores, se han encontrado varias configuraciones en la bibliografía consultada. En la Tabla 7 se han resumido sus características analíticas, incluyendo información acerca de la metodología empleada y del tipo de muestras analizadas. Como ejemplos, citar el desarrollado por Messina basado en la inmovilización del anticuerpo de la IL-6 sobre vidrio de poro controlado modificado con 3-aminopropilo, incorporado a un sistema microfluídico. Posteriormente se establece un inmunoensayo tipo sándwich empleando un anticuerpo secundario biotinilado. La detección se lleva a cabo mediante el uso de estreptavidina marcada con la enzima fosfatasa alcalina [Messina, 2008]. Otras configuraciones tipo sándwich emplean bien SWCNTs o nanopartículas de oro modificadas con glutatión (GSH-AuNP) para inmovilizar el anticuerpo primario y un anticuerpo secundario biotinilado conjugado con estreptavidina marcada con HRP. Como puede observarse en la Tabla, este inmunosensor posee un límite de detección de 10 pg/mL, tres veces menor que el obtenido con la configuración basada en el empleo de SWCNTs. Sin embargo, el primero posee un intervalo lineal mucho más

amplio (20–4000 pg/mL frente a 40–150 pg/mL) [Munge, 2009]. En otro trabajo se emplearon SWCNTs alineados verticalmente para inmovilizar el anticuerpo primario y preparar un inmunoensayo tipo sándwich, usando un anticuerpo secundario biotinilado conjugado con estreptavidina marcada con HRP, o bien nanotubos carboxilados modificados con el anticuerpo secundario y marcados con HRP (con 106 moléculas de HRP por cada 100 nm de nanotubos carboxilados). Esta última configuración proporcionó un mejor límite de detección, de 0.5 pg/mL, en suero bovino [Malholtra, 2010].

En un trabajo posterior se emplearon nanopartículas poliméricas porosas con ferroceno encapsulado en el interior de la estructura polimérica, conjugadas con el anticuerpo secundario de la IL-6. El inmunosensor de tipo sándwich desarrollado se preparó inmovilizando covalentemente el anticuerpo primario de la IL-6 sobre un electrodo de carbono vitrificado modificado con óxido de grafeno carboxilado. El límite de detección alcanzado, mediante medida de la respuesta del ferroceno por voltamperometría de onda cuadrada, fue de 1 pg/mL [Li, 2011]. En otra configuración, desarrollada por Deng y col., se inmovilizó covalentemente el anticuerpo sobre un electrodo de oro modificado con una monocapa de ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA). En esas condiciones, la transferencia de carga del ferrocianuro a la superficie del electrodo está bloqueada. Sin embargo, tras la reacción de afinidad con el antígeno y con el anticuerpo secundario conjugado con nanopartículas de oro estabilizadas con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) cargadas positivamente, se obtuvo una respuesta mediante voltamperometría de onda cuadrada proporcional a la concentración de IL-6 en el intervalo de concentración comprendido entre 5 y 50000 pg/mL, siendo el límite de detección de 2 pg/mL [Deng, 2011].

Peng y colaboradores utilizaron esferas huecas de fosfato de titanio modificadas con nanopartículas de plata y conjugadas con el anticuerpo secundario. El inmunosensor de tipo sándwich se construye inmovilizando nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizadas con el anticuerpo primario sobre los pocillos de una placa con la ayuda de un imán. La determinación se realiza midiendo los iones plata liberados tras tratamiento con ácido de la placa y medida de la respuesta de la disolución obtenida mediante stripping voltamperométrico [Peng, 2011]. En otra de las configuraciones tipo

sándwich se empleó un nuevo método de amplificación dual de la señal que implica la inmovilización del anticuerpo primario sobre un electrodo ITO modificado con AuNPs-polidopamina, así como la funcionalización múltiple del anticuerpo secundario con HRP a través del compósito AuNP–polidopamina-CNTs. El límite de detección alcanzado fue de 1.0 pg/mL [Wang, 2011L]. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo desarrolló otra configuración basada en el empleo de un compósito sol-gel-grafeno-AuNPs para inmovilizar el anticuerpo de captura y un bioconjugado de AuNP-polidopamina y nanotubos de carbono sobre el que se inmoviliza el anticuerpo secundario y la enzima peroxidasa por el método de la carbodiimida, siendo el límite de detección de 0.3 pg/mL [Wang, 2013].

**Tabla 6.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de interleucina 6.

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, pg/mL	LD, pg/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Abcam ab100572 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	1.37 – 1000	<3	Suero humano, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	4h 45min
Abcam ab46029 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-mAb. Detección con HRP-Strept y TMB	31.25 – 1000	<5	Suero humano, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	1h 40min
Abcam ab100573 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	1.37 – 1000	<30	Extractos de cultivos celulares o extractos de tejidos humanos	4h 45min
Abcam ab46027 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-mAb. Detección con HRP-Strept y TMB	6.25 – 200	<2	Cultivo de células sobrenadante, Suero, Plasma humano	1h 45min
Abcam ab108867 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-mAb. Detección con HRP-Avidin-HRP y TMB	8 – 500	>8	Sobrenadante de cultivo de células, Suero, Plasma humano	5h
Abcam ab48479 IL-6 (Interleukin-6) Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-mAb. Detección con HRP-Strept y TMB	6.25 – 200	<2	Sobrenadante de cultivo de células, Suero, Plasma humano	3d
Assaypro Assay Max Human IL-6 (Interleukin-6) Elisa Kit EI1006-1	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-pAb. Detección con HRP-Strept	8 – 500	8	Sobrenadante de cultivo de células, Suero, Plasma humano	4h 42min
Uscn SEA079Hu Tests ELISA KIT (Human)	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.156 – 10	0.051	Suero, plasma, tejidos homogeneizados, lisados celulares, sobrenadantes de cultivo celular y otros fluidos biológicos de humanos	4h 30min

**Tabla 6.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de interleucina 6 (continuación).

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, pg/mL	LD, pg/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Abnova KA0123 (Humano)	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	1.56 – 100	0.92	Cultivo de células sobrenadante de plasma (citrato, EDTA, heparina), Suero	4h 25min
Abnova KA0124 (Humano)	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	80 – 5000	10	Líquido amniótico, sobrenadante de cultivo celular, Plasma (EDTA, heparina), suero, orina	3h 25min
Bionova Human IL-6 ELISA ELH-IL6-001	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	3 – 1000	3	Suero humano, plasma, sobrenadantes de cultivo celular y orina	4h 45min
Bionova Human IL-6 ELISA OKAA00012-48W	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotin-mAb. Detección con HRP-Strept	0 – 250	2	Suero humano, plasma, sobrenadantes de cultivo celular	3h 45min

**Abreviaturas:** **Avidin:** avidina; **biotin:** biotina; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IL-6:** interleucina 6; **LD:** límite de detección; **mAb:** anticuerpo monoclonal; **pAb:** anticuerpo policlonal; **Strept:** estreptavidina; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

**Tabla 7.** Inmunosensores electroquímicos para la determinación de interleucina 6.

Inmunosensor	Tipo de ensayo y metodología	Detección	Características analíticas	Muestra	Ref.
Inmunosensor basado en electrodo ITO modificado con película sol-gel de AuNPs/grafeno/sílice	Inmunoensayo tipo sándwich con amplificación mediante HRP-Ab <sub>2</sub> /AuNPs/PDA/CNTs	Amperometría	IL: 1 – 40 pg/mL LD: 0.3 pg/mL (3s)	Suero	Wang, 2013
Inmunosensor basado en electrodo GCE modificado con GO	Inmunoensayo tipo sándwich amplificando la señal mediante la inmovilización de anti-IL6 secundario en nanopartículas PPN-Fc obtenidas por CaCO <sub>3</sub> , PDDA y Fc.	SWV	IL: 2 – 20,000 pg/mL LD: 1 pg/mL (S/N=3)	Suero	Li, 2011
Inmunosensor con electrodo de PG modificado con SWCNTs	Inmunoensayo tipo sándwich mediante la inmovilización de anti-IL6 secundario sobre MWCNTs-COOH con 106 HRP por 100 nm	Amperometría	IL: 0.5 – 5 pg/mL LD: 0.5 pg/mL	Suero	Malhotra, 2010
Inmunosensor basado en (a) SWCNTs alineados verticalmente y (b) GSH-AuNPs	Inmunoensayo tipo sándwich amplificado con marcaje múltiple de Ab <sub>2</sub> -biotin-HRP-Strept	Amperometría	RD: 40 – 150 pg/mL; LD: 30pg/mL RD: 20 – 4000 pg/mL; LD:10pg/mL	Suero	Munge, 2009
Inmunosensor microfluidico con anti-IL-6 inmovilizado sobre APCPG.	Inmunoensayo tipo sándwich empleando Ab <sub>2</sub> -biotin, AP-Strept y p-APP como sustrato.	Amperometría	IL: 0-400pg/mL LD: 0.41 pg/mL (3s)	Suero	Messina, 2008
Inmunosensor basado en electrodo ITO modificado con PDOP y AuNPs	Inmunoensayo tipo sándwich amplificado con sonda de HRP-Ab <sub>2</sub> -AuNP-PDOP/CNT.	Amperometría	IL: 4.0 – 800 pg/mL LD: 1.0 pg/mL (S/N=3)	Suero	Wang, 2011L
Inmunosensor basado en electrodo de AuE modificado con 11-MUA	Inmunoensayo tipo sándwich amplificado con Ab <sub>2</sub> -CTAB recubierto con AuNPs empleando Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> para la detección.	SWV	IL: 5.0 – 50,000 pg/mL LD: 2.0 pg/mL (S/N=3)	Suero	Deng, 2011
Inmunosensor basado en anti-IL6-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNPs.	Inmunoensayo tipo sándwich amplificado con Ab <sub>2</sub> -AgNP-TIP.	DPSV	IL: 0.5 – 10,000 pg/mL LD: 0.1 pg/mL (S/N=3)	Suero humano	Peng, 2011

**Abreviaturas:** 11-MUA: ácido 11-mercaptoundecanoico; **Ab**: anticuerpo; **Ab<sub>2</sub>**: anticuerpo secundario; **AgNP**: nanopartículas de plata; **AP**: fosfatasa alcalina; **APCPG**: vidrio de poro controlado modificado con grupos 3-aminopropilo; **AuE**: electrodo de oro; **AuNP**: nanopartículas de oro; **biotin**: biotina; **CNTs**: nanotubos de carbono; **CTAB**: bromuro de cetiltrimetilamonio; **DPSV**: voltamperometría de redisolución por diferencial de impulsos; **EDTA**: ácido etilendiamino tetraacético; **Fc**: ferroceno; **GCE**: electrodo de carbono vitrificado; **GO**: óxido de grafeno; **GSH**: glutatión; **HRP**: peroxidasa de rábano; **IL-6**: interleucina 6; **ITO**: óxido de indio y estaño; **LD**: límite de detección; **p-APP**: p-aminofenilfosfato; **PDA**: detector array de fotiodos; **PDDA**: polidialil dimetilamonio; **PDOP**: polidopamina; **PG**: polietilenglicol; **PPN-Fc**: nanopartículas de polielectrólito poroso funcionalizadas con ferroceno; **RD**: rango dinámico; **Strept**: estreptavidina; **SWCNTs**: nanotubos de carbono de pared simple; **SWV**: voltamperometría de onda cuadrada; **TIP**: fosfato de titanio

### 2.6.3. Adiponectina

Los primeros métodos utilizados para evaluar los niveles plasmáticos de adiponectina fueron cromatográficos y electroforéticos. Hace algunos años, se realizaban análisis mediante SDS-PAGE, Western blot y una densitometría para la medida de las bandas. Otros autores realizaban una separación por cromatografía de filtración en gel y analizaban las fracciones eluídas por SDS-PAGE. Posteriormente, Arita et al. desarrollaron el primer ensayo ELISA y actualmente existen muchos en el mercado [Arita, 1999]. En la Tabla 10 se resumen algunos de los más representativos disponibles en forma de “kits”, incluyendo información acerca de la metodología empleada, intervalo de concentración, límite de detección, precisión, tipo de muestra y tiempo de ensayo. Como puede observarse, todos los inmunoensayos son de tipo sándwich, utilizando anti-APN y un anticuerpo biotinilado y HRP-Strept o HRP-Avidin o un anticuerpo secundario marcado con la misma enzima. La formación del inmunocomplejo se detecta colorimétricamente con TMB y peróxido de hidrógeno.

Existe una gran variabilidad en las características analíticas que presentan estos sistemas. Así, el intervalo dinámico de los calibrados se extiende a concentraciones que alcanzan valores máximos de 200 ng/mL y los límites de detección, relativamente bajos, pueden llegar a 0.032 pg/mL. En cuanto a los tiempos de ensayo, son muy largos, el más breve requiere más de 3 horas.

La mayoría de los ensayos ELISA son adecuados para la determinación de adiponectina total. Hayama et al. desarrollaron un inmunoensayo enzimático con detección quimioluminiscente para la determinación de adiponectina de alto peso molecular, HWM, en muestras de plasma y suero. Para ello, emplearon partículas de ferrita conjugadas con un anticuerpo monoclonal de adiponectina y el mismo anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina como anticuerpo de detección. De esta forma, únicamente se obtiene señal para la adiponectina de elevado peso molecular formada por 4 ó 6 trímeros de adiponectina [Hayama, 2010].

En lo que respecta al empleo de inmunosensores, no se ha encontrado ninguna configuración descrita en la bibliografía para esta hormona. Sin embargo, se ha localizado un trabajo en el que se estudia el comportamiento electroquímico de la adiponectina sobre un electrodo de pasta de carbono basándose en la electroactividad

de los aminoácidos tirosina y triptófano, que proporcionan señales de oxidación a 0.78 y 0.92 V, respectivamente. La fuerte adsorción de la adiponectina sobre la superficie electródica permite su determinación mediante voltamperometría de onda cuadrada de redisolución adsorptiva, obteniéndose un calibrado lineal entre 0.5 y 50 ng/mL y un límite de detección de 50 pg/mL. A pesar del bajo límite de detección, el elevado potencial de la señal no permite la determinación selectiva de adiponectina, por lo que no ha sido aplicado al análisis de muestras reales de interés clínico como suero, saliva y orina [Sobrova, 2012].

**Tabla 8.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de adiponectina.

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, ng/mL	LD, ng/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Abcam ab99968	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.025 – 18	< 0.025	Saliva, suero, orina, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	4h 45 min
APN-Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.781 – 50	0.7	Saliva, suero, orina, leche, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h
Abcam ab108786	Inmunoensayo tipo sándwich con pAb y HRP-pAb. Detección con TMB	1 – 150	0.47	Suero, plasma, orina, leche, sobrenadantes de cultivo celular o fluido cerebroespinal	2 h 30 min
APN-Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y pAb. Detección con HRP-anti-IgG y TMB	0.5 – 32	0.1	Suero, orina, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h 20 min
Abnova KA0017	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y pAb. Detección con HRP-anti-IgG y TMB	0.375 – 12	0.0234	Suero, plasma o sobrenadante de cultivo de adipocitos	3 h 30 min
APN-Human ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y mAb-biotin. Detección con HRP-Strept y TMB	0.78 – 50	0.086	Suero, plasma, sobrenadantes de cultivo celular	—
Adipogen	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y HRP-Ab. Detección con TMB	1 – 150	0.47	Suero, orina, plasma o fluido cerebroespinal	2 h 10 min
AG-45A-0001Y	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y pAb. Detección con anti-IgG-HRP y TMB	0.5 – 32	0.1	Suero, orina, plasma o sobrenadantes de cultivo o tejido celular	3 h 20 min
APN-Human ELISA Kit	Inmunoensayo competitivo indirecto entre APN inmovilizada en el pocillo y APN en disolución por los sitios de unión del HRP-Ab en disolución. Detección con TMB	—	7	Suero o plasma	2 h 25 min
eBioscience BMS2032 Human APN Platinum ELISA	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotin-mAb. Detección con HRP-Strept y TMB	0.78 – 50	0.01	Suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h 30 min
Enzo ALX-850-377-K101 APN-Human ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con pAb y HRP-pAb. Detección con TMB	1 – 150	0.47	Suero, orina, leche, plasma o fluido cerebroespinal	3 h

**Tabla 8.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de adiponectina (continuación).

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, ng/mL	LD, ng/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Hözel EA2500-1 Assaypro Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.78 – 50	0.7	Saliva, suero, orina, leche, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h
Life Technologies KHP0041 Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.5 – 32	0.1	Suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h 20 min
Merck Millipore EZHADP-61K Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	1.5 – 100	1.5	Suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	3 h
Mercodia 10-1193-01 APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y HRP-Ab. Detección con TMB	5 – 300	1.25	Suero o plasma	2 h 15 min
Phoenix Pharmaceuticals EK-ADI-01 APN-Human ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.15 – 10	0.15	Plasma, tejidos homogeneizados o fluido cerebroespinal	5 h 25 min
RayBio® ELH-APN-001 Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.082 – 0.104	0.025	Suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	4 h 45 min
R&D Systems DRP300 Human total APN Quantikine ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y HRP-mAb. Detección con TMB	3.9 – 250	0.891	Suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular	4 h 30 min
Sigma-Aldrich RAB0005-1KT Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	0.1 – 1	2.47	Suero, plasma, lisados celulares o sobrenadantes de cultivo celular	4 h 45 min
TECOMEDICAL TE1014 Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y HRP-Ab. Detección con TMB	1 – 100	< 0.6	Saliva, suero, plasma, orina, leche, sobrenadantes de cultivo celular o fluido cerebroespinal	2 h 15 min
Uscn SEA605Hu Human-APN ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-avidin y TMB	0.156 – 10	0.062	Suero, plasma, lisados celulares, tejidos homogeneizados o fluidos biológicos humanos	4 h 30 min

**Abreviaturas:** **Ab:** anticuerpo; **APN:** Adiponectina; **Avidin:** avidina; **biotin:** biotina; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IgG:** inmunoglobulina G; **LD:** límite de detección; **mAb:** anticuerpo monoclonal; **pAb:** anticuerpo policlonal; **Strept:** estreptavidina; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

### 3.6.4. Ceruloplasmina

Entre los métodos encontrados en la bibliografía para la determinación de ceruloplasmina cabe citar varios bioensayos colorimétricos basados en la actividad oxidasa de esta proteína empleando sustratos tales como *p*-fenilendiamina [Henry, 1960; Sunderman, 1970] o dianisidina (3,3'-dimetoxibencidina) [Schosinsky, 1974], así como métodos cinéticos empleando N,N-dimetilfenilendiamina (DPPD) [Mukerjee, 1990] o Fe<sup>2+</sup> [Winkles, 1988; Erel, 1998]. Como técnicas de detección se han empleado la turbidimetría [Korman, 2008; Hammett Stabler, 1996], la de plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICPMS) [López-Ávila, 2006] y la redisolución potenciométrica [Pinilla, 1995]. En cuanto a los inmunosensores, sólo se ha encontrado un ejemplo en la bibliografía. Se trata de un inmunosensor piezoeléctrico reutilizable basado en la modificación del cristal con una fina película polimérica de *n*-butilamina mediante la técnica de plasma y, posteriormente, a través de los grupos amino con polianiones alginato. El anticuerpo se inmoviliza de forma reversible por atracción electrostática sobre la superficie modificada. La adición de polietilenglicol al medio de ensayo se realiza para estimular la aglutinación del inmunocomplejo, dando lugar a la amplificación de la señal. De este modo, se obtiene un intervalo lineal entre 0.31 y 27.0 µg/mL y se alcanza un límite de detección de 0.15 µg/mL [Wang, 2004].

Más recientemente, se ha desarrollado un ensayo automatizado de ceruloplasmina para la detección temprana de la enfermedad de Wilson. El análisis de esta proteína en orina se basa en un ensayo de inmunoaglutinación en látex [Nakayama, 2008]. Posteriormente, Li y col. prepararon un biosensor fluorescente basado en el empleo de “quantum dots” que presenta una respuesta rápida y ultrasensible a nitrato de ceruloplasmina, con un límite de detección de 8 ng/mL [Li, 2010].

Asimismo, se han descrito diferentes inmunoensayos para la determinación de ceruloplasmina, en algunos casos disponibles comercialmente en forma de “kits”. En la Tabla 8 se han resumido las características analíticas de algunos ejemplos representativos. Como puede observarse, se han diseñado configuraciones de inmunoensayo tanto competitivo como tipo sándwich, para la determinación de esta proteína, basadas mayoritariamente en el empleo de inmunorreactivos biotinilados (Cp-biotin o anti-Cp-biotin). Por otro lado, la detección colorimétrica se basa en la reacción habitual, usando avidina o estreptavidina marcada con

peroxidasa, seguido de la adición de peróxido de hidrógeno y desarrollo del color con tetrametilbencidina (TMB). Puede apreciarse que los intervalos de los calibrados cubren márgenes de concentración variables, normalmente comprendidos entre algunas unidades y varias centenas de ng/mL, o de décimas a decenas de  $\mu\text{g/mL}$ . Los límites de detección, expresados como concentración mínima detectable, también varían, siendo mayoritariamente de unidades o centenas de ng/mL. En cuanto a la precisión, los valores más bajos de la desviación estándar relativa (RSD) para intra-ensayos se encuentran situados al nivel de un 4%, alcanzando en ocasiones valores próximos al 10% o superiores en los inter-ensayos. Estos diseños comerciales son aplicables a muestras de suero, plasma y otras muestras biológicas. Destaca el Abnova KA0470 por su versatilidad, ya que puede utilizarse también para muestras de saliva, orina y leche. Finalmente, en general, los tiempos de análisis son largos, de más de tres horas o incluso de cuatro en algún caso.

**Tabla 9.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de ceruloplasmina.

Sistema	Características	Intervalo, ng/mL	LD, ng/mL	Precisión, RSD %	Muestras	Tiempo
Assaypro Assay Max Human Ceruloplasmin ELISA Kit EC4001-1	Inmunoensayo competitivo con pAb entre Cp y Cp-biotin. Detección con HRP-Strept/TMB	630 - 4x10 <sup>4</sup>	100	4.0 (intra-ensayo); 7.0 (inter-ensayo)	Plasma humano, suero	2h 47min
Usn E90909Hu96 Tests ELISA Kit (humano)	Inmunoensayo tipo sándwich con mAb y pAb-biotin. Detección con Avidin-HRP/TMB	9.4 - 600	<3.4	<10 (intra-ensayo); <12 (inter-ensayo)	Suero humano, plasma, piel, células	3h 45min
Usn C90909Ra96 Tests ELISA Kit (rata)	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y Ab-biotin. Detección con Avidin-HRP/TMB	6.25 - 400	2.01	<10 (intra-ensayo); <12 (inter-ensayo)	Suero de rata, plasma, otros fluidos	3h 45min
Mybiosource MBS701656	Inmunoensayo competitivo con Ab y HRP-Ab. Detección con TMB	(1.5 - 50) x 10 <sup>4</sup>	7500	Sin dato	Suero humano, plasma	1h 45min
Abnova KA0469	Inmunoensayo competitivo con pAb entre Cp y Cp-biotinilado. Detección con HRP-Strept/TMB	630 - 4x10 <sup>4</sup>	100	4.1 (intra-ensayo); 7.2 (inter-ensayo)	Plasma humano, suero	2h 47min
Abnova KA0470	Inmunoensayo tipo sándwich con pAb y biotin-pAb. Detección con HRP-Strept/TMB	1.25 - 320	~1	4.1 (intra-ensayo); 7.1 (inter-ensayo)	Orina humana, saliva, leche, células	3h 40min
Pro Alt Human Ceruloplasmin ELISA Quantitation Kit PRO-20074F	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y HRP-Ab. Detección con HRP-avidin/TMB	3.9 - 250	Sin dato	Sin dato	Suero humano, otras muestras biológicas	4h
MDbioproducts Human ceruloplasmin MO46029	Inmunoensayo competitivo con pAb entre Cp y Cp-biotin. Detección con HRP-Strept/TMB	630 - 2 x 10 <sup>4</sup>	<60	4.2 (intra-ensayo); 7.3 (inter-ensayo)	Suero humano, plasma	2h 40min

**Abreviaturas:** Avidin: avidina; biotin: biotina; Cp: ceruloplasmina; HRP: peroxidasa de rábano; pAb: anticuerpo policlonal; Strept: estreptavidina; TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

### 3.6.5. Fibrinógeno

Los laboratorios clínicos utilizan distintos ensayos para determinar fibrinógeno [De Maat, 1999], que varían entre sí en el tiempo de análisis y en el grado de experiencia o el equipo necesario para su realización. Algunos se emplean en situaciones de emergencia, donde no es necesario conocer la cantidad exacta de fibrinógeno sino simplemente si sus niveles son normales. Así, por ejemplo, existe una amplia gama de coagulómetros automatizados que utilizan diferentes tecnologías para detectar el punto final del coágulo de fibrina. Por otro lado, el método de Clauss es el más utilizado en los laboratorios para la cuantificación de fibrinógeno. Se basa en la adición de un exceso de trombina a un plasma diluido, siendo el tiempo de coagulación inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno plasmático [Clauss, 1957]. El uso de una alta concentración de trombina permite asegurar que el tiempo de coagulación será independiente de la concentración de trombina, para un amplio intervalo de concentraciones de fibrinógeno. Este ensayo requiere un plasma de referencia con una concentración conocida de fibrinógeno, con el que se realiza un calibrado representando el tiempo de coagulación en función de la concentración del analito, en g/L. Relacionados con éste, también se usan los métodos derivados de la medida del tiempo de protombina [Chitolie, 1994; Rossi, 1988]. Los ensayos de coagulación de proteína son muy exactos y han sido utilizados como métodos de referencia en la determinación de Fib. En estos ensayos, se añade trombina al plasma en ausencia de iones calcio. El coágulo se lava y después se disuelve en urea alcalina u otro reactivo y se realiza una estimación espectrofotométrica de la concentración de proteína [Gaffney, 1992].

Los inmunoensayos para la determinación de Fib son adecuados para estudios que evalúan el nivel de fibrinógeno como factor de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [Cremer, 1994; Sweetnam, 1996; Sweetnam, 1998]. Como ejemplos de los métodos de inmunoensayo tipo ELISA, en la Tabla 9 se han resumido las características analíticas de algunos ejemplos representativos, disponibles comercialmente en forma de “kit” comerciales para la determinación de fibrinógeno. Como puede observarse, los inmunoensayos son tanto de tipo sándwich como competitivo. La mayoría de ellos se basan en la unión de afinidad biotina-

estreptavidina empleando peroxidasa como trazador enzimático, llevándose a cabo la detección colorimétrica empleando TMB y peróxido de hidrógeno

Los intervalos dinámicos de los calibrados varían desde las unidades de ng/mL hasta varias decenas de µg/mL. Los límites de detección varían desde las décimas hasta las centenas de ng/mL. La mayoría se aplican al análisis de plasma, y algunos de ellos a muestras de orina y saliva. Los tiempos de ensayo son generalmente largos, llegando a durar hasta 4 horas.

Como ejemplos de los biosensores para fibrinógeno descritos en la bibliografía, puede citarse el nanosensor desarrollado por Chen y col. basándose en el hecho conocido de que la trombina cataliza la formación de largas cadenas de fibrina a partir de fibrinógeno. Esto induce a la formación de agregados de AuNPs marcadas con trombina cuando éstas se ponen en contacto con una disolución que contiene fibrinógeno, y que pueden ser detectados espectrofotométricamente. El límite de detección de fibrinógeno en plasma fue de 10 nM [Chen, 2011]. También se ha descrito un biosensor regenerable capaz de medir la concentración de fibrinógeno a tiempo real en muestras de suero sin necesidad de dilución. Se basa en la fuerte adsorción de la proteína IgM sobre cristales SPR, y su desplazamiento por el fibrinógeno de forma más significativa que por otras proteínas presentes en la muestra, lo que da lugar a un cambio en el índice de refracción que se monitoriza midiendo la variación del ángulo de resonancia del cristal. El biosensor SPR tiene una sensibilidad de 42 mDeg/(mg/mL) para concentraciones de fibrinógeno en el intervalo de 0.5 a 2.5 mg/mL [Wang, 2011BB]. A pesar de las importantes ventajas, ya citadas, que ofrece la detección electroquímica, son escasos los biosensores electroquímicos encontrados en la bibliografía. El grupo de Yang desarrolló un dispositivo desechable para la determinación de trombina basado en el empleo de un co-sustrato que compite con el fibrinógeno de la disolución por la interacción con la trombina inmovilizada sobre un electrodo desechable. La hidrólisis del co-sustrato por la enzima da lugar a la formación de un compuesto que es detectado amperométricamente [Yang, 2005].

Tang y col. han desarrollado varias configuraciones basadas en la realización de inmunoensayos tipo sándwich sobre placas ELISA para la determinación de la forma

nitrada del fibrinógeno, empleando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. El producto de oxidación generado en la reacción enzimática en presencia de *o*-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno es detectado mediante voltamperometría de onda cuadrada depositando 50  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante sobre un electrodo de carbono desechable. Se alcanzan límites de detección entre 0.9 y 13.5 pM, e intervalos de linealidad hasta 1.5-3.0 nM dependiendo de la estrategia empleada [Tang, 2010].

En relación a los inmunosensores, en la Tabla 10 se han resumido las características analíticas de varios de ellos. Como puede verse, algunas configuraciones utilizan nanopartículas, como la desarrollada por Jiang y col., basada en la adsorción de anti-Fib sobre AuNPs. Tras la reacción de afinidad entre los conjugados anti-Fib-AuNPs y el fibrinógeno presente en la muestra, se produce la liberación de las nanopartículas, las cuales, en presencia de polietilenglicol, dan lugar a la formación de agregados de mayor tamaño y, consecuentemente, a un aumento en la intensidad de dispersión de resonancia proporcional a la concentración de fibrinógeno en el intervalo comprendido entre 0.027 y 1.07  $\mu\text{g/mL}$ . El límite de detección alcanzado en este método fue de 1.14 ng/mL [Jiang, 2006]. Este mismo grupo de investigación desarrolló un inmunoensayo empleando nanopartículas de plata. En este caso, la reacción antígeno-anticuerpo libera el anticuerpo inicialmente unido a las nanopartículas. Estas últimas se agregan aumentando de tamaño y precipitando sobre las paredes del tubo, lo que conduce a una disminución de la intensidad de dispersión de resonancia también proporcional a la concentración de fibrinógeno [Jiang, 2007]. Aizawa y colaboradores desarrollaron un inmunosensor para la detección de fibrinógeno y sus productos de degradación basado en la detección, mediante una microbalanza de cuarzo, de la reacción de aglutinación que tiene lugar cuando se ponen en contacto partículas de látex marcadas con el anticuerpo con una disolución del antígeno [Aizawa, 2004].

Más recientemente, en nuestro Grupo se desarrollaron dos configuraciones de magnetoinmunosensores empleando nanoanticuerpos (nanobodies) como elemento de reconocimiento. En la primera se utilizaron micropartículas magnéticas carboxiladas para la inmovilización del nanoanticuerpo del fibrinógeno y posterior competición

entre Fib (analito) y biotin-Fib por los sitios de unión del nanoanticuerpo y, en la segunda, competían Fib libre en disolución y Fib inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con un tag de histidina por los sitios de unión del nanoanticuerpo biotinilado. Para la detección, en ambos casos, el conjugado de partículas magnéticas se depositaba sobre la superficie de un SPCE, monitorizando la reacción de afinidad por medida de la corriente catalítica a -0.2 V tras adición de peróxido de hidrógeno, con hidroquinona como mediador redox. Se encontró que el formato de ensayo competitivo indirecto proporcionaba mejores características analíticas con un límite de detección de 0.044 µg/mL de fibrinógeno [Campuzano, 2014].

Otra configuración desarrollada por miembros de nuestro Grupo fue un magnetoinmunoensensor basado en la inmovilización de fibrinógeno biotinilado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina. Se establecía un esquema de inmunoensayo competitivo indirecto entre el fibrinógeno inmovilizado y el fibrinógeno de la disolución por los sitios de unión del anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa, aplicando seguidamente la metodología de detección explicada en el ejemplo anterior. El tiempo de ensayo fue de 80 minutos y el límite de detección alcanzado, de 0.8 ng/mL [Torrente-Rodríguez, 2014].

**Tabla 10. Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de Fibrinógeno.**

Sistema de inmunoensayo	Características	Intervalo, µg/mL	LD, ng/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Abcam ab108841 (Fibrinógeno humano) ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	(1.25-80)×10 <sup>-3</sup>	1	Saliva, leche, orina, sobrenadantes de cultivo celular	4h
Abcam ab108842 (Fibrinógeno humano) ELISA kit	Inmunoensayo tipo competitivo con Ab y biotín-Fib. Detección con HRP-Strept y TMB	0.165-40	160	Plasma	3h
Abcam ab171578 (Fibrinógeno humano) ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab de captura y Ab de detección. Detección con HRP y TMB	(0.14-100)×10 <sup>-3</sup>	0.139	Plasma, medio de cultivo celular, plasma EDTA	2h
Gen Way 40-288-22856 Human ELISA Kit	Inmunoensayo tipo sándwich con anti-Fib inmovilizado y HRP-anti-Fib. Detección colorimétrica usando TBM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(6.25-400)×10 <sup>-3</sup>	-	Plasma	4h
Gentaur Assay Max human ELISA kit EF1040-1	Inmunoensayo competitivo directo entre Fib y biotín-Fib por los sitios de unión del anti-Fib inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seguido de la adición de HRP-Strept	0.16-120	100	Plasma	2h 30min
Alpco41-FIBHU-E01 Human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con anti-Fib inmovilizado y anti-Fib-HRP. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mayor de 0.4	-	Plasma	1h 30min
Assaypro AssayMax Human Fibrinogen ELISA Kit EF1040-1	Inmunoensayo tipo competitivo con Fib analito y Fib biotinilado. Detección con HRP-Strept y TMB	0.165-40	160	Plasma	2h 42min
Assaypro AssayMax Human Fibrinogen ELISA Kit EF2040-1	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotín-Ab. Detección con HRP-Strept y TMB	(1.25-80)×10 <sup>-3</sup>	1	Medio de cultivo celular, leche, orina y saliva	3h 38min

**Tabla 10.** Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de Fibrinógeno (continuación).

Sistema de inmunoensayo	Características	Intervalo, $\mu\text{g/mL}$	LD, ng/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Molecular Innovations HFIBKT human ELISA kit	Inmunoensayo tipo sándwich con anti-Fib inmovilizado, biotin-anti-Fib y HRP-Avidin. Detección colorimétrica usando $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$	$(3.12-800)\times 10^{-3}$	1.4	Plasma	4h
Abnova Fibrinogen KA0475 (Human)	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre Fib analito y Fib biotinilado con anti-Fib inmovilizado. Detección colorimétrica usando $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$ con HRP-Strept.	0.165-40.0	160	Plasma	2h 30min
Abnova Fibrinogen KA0476 (Human)	Inmunoensayo tipo sándwich con Ab y biotin-Ab. Detección colorimétrica con HRP-Strept y TMB.	$(1.25-80)\times 10^{-3}$	1	Medio de cultivo celular, leche, orina y saliva.	<4h

**Abreviaturas:** **Ab:** anticuerpo; **anti-Fib:** anticuerpo del fibrinógeno; **biotin-Ab:** anticuerpo biotinilado; **biotin-Fib:** fibrinógeno biotinilado; **HRP:** peroxidasa; **LD:** límite de detección; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; **Strept:** estreptavidina

Tabla 11. Biosensores para la determinación de Fibrinógeno.

Tipo de inmunosensor	Tipo de Inmunoensayo	Detección	Características analíticas	Muestra	Referencia
HRP-Strept/biotin-Fib+Fib/ /anti-FibNb-MBs/SPCE.	Inmunoensayo competitivo directo entre Fib y Fib biotinilado con anti-FibNb inmovilizado sobre His-Tag-MBs/SPCE. Posterior inmov. de estreptavidina-HRP y detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de HQ.	Amperometría -200 mV	IL: 0.5-250 µg/mL LD: 0.49 µg/mL	Plasma certificado	Campuzano, 2014
HRP-Strept/biotin-anti-FibNb+Fib /Fib/MBs/SPCE	Inmunoensayo competitivo indirecto con Fib inmov. sobre HOOC-MBs/SPCE por reacción del anti-FibNb biotinilado libre al Fib inmovilizado. Posterior inmov. HRP-Strept y detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de HQ.	Amperometría -100 mV	ID: 0.018 – 2.208 µg/mL LD: 0.004 µg/mL	Plasma certificado	Díez, 2013
HRP-Strept/biotin-anti-Fib +Fib/Fib-biotin/Strept/AuNPs-biotin	Electropolim. de biotin-AuNPs sobre electrodos de oro e inmov. de Strept. y Fib-biotin. Inmunoensayo competitivo indirecto entre Fib analito y Fib inmovilizado por los sitios de unión al HRP-anti-Fib y detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de HQ.	Amperometría -200 mV	IL: 0.004 – 0.8 µg/mL LD: 0.0008 µg/mL	Plasma certificado	Torrente-Rodríguez, 2014
anti-Fib-AgNPs	La reacción de afinidad entre anti-Fib-AgNPs y Fib, provoca la liberación de las AuNPs, que se agregan y precipitan sobre las paredes del tubo, lo que disminuye la intensidad de dispersión de resonancia	Dispersión de resonancia	IL: 0.067 – 1.67 µg/mL LD: 0.024 µg/mL	Plasma humano.	Jiang, 2007
anti-Fib-AuNPs.	La reacción de afinidad entre anti-Fib-AuNPs y Fib, provoca la liberación de las AuNPs, las cuales se agregan y aumentan de tamaño dando lugar a un aumento de intensidad de dispersión de resonancia	Dispersión de resonancia	IL: 0.027 – 1.07 µg/mL LD: 0.00114 µg/mL	Plasma humano.	Jiang, 2006

**Tabla 11.** Biosensores para la determinación de Fibrinógeno (continuación).

Tipo de inmunosensor	Tipo de Inmunoensayo	Detección	Características analíticas	Muestra	Referencia
IgM/Cristal SPR-Cr	Adsorción competitiva de proteínas de inm. de IgM sobre cristal SPR, el cual es desplazado por el Fib de la muestra de suero	SPR	IL: 0.5 – 2.5 mg/mL	Suero	Wang, 2011BB
Trombina/AuNPs	Formación de agregados de NPs en contacto con Fib	Espectrofotométrico	IL: hasta 150 nM LD 10 nM	Plasma	Chen, 2011
Trombina/SPAuE	Biosensor enzimático competitivo	Cronoamperometría	IL: 1 – 3 mg/mL	Plasma	Yang, 2005

**Abreviaturas:** **Ab:** anticuerpo; **AgNPs:** nanopartículas de plata; **anti-FibNb:** nanoanticuerpo del fibrinógeno; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **biotin:** biotina; **Fib:** fibrinógeno; **His-Tag:** tag de histidina; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa; **ID:** intervalo dinámico; **IgM:** inmunoglobulina M; **IL:** intervalo lineal; **RSD:** desviación estándar relativa; **MBs:** micropartículas magnéticas; **Nb:** nanoanticuerpo; **SPAuE:** electrodos serigrafados de oro; **SPCEs:** electrodos de carbono serigrafados; **SPR:** resonancia de plasmón superficial; **Strept:** estreptavidina

### 3.6.6. Estradiol

La determinación de estradiol y de compuestos relacionados en muestras biológicas, farmacéuticas y de aguas se ha llevado a cabo mediante diversas técnicas, como cromatografía de gases [Stopforth, 2007; Kawaguchi, 2006] y de líquidos [Jiang, 2009; Havlíková, 2006]. También se han empleado métodos electroquímicos, como voltamperometría [Liu, 2007; Salcý, 2002] y cronoamperometría [Vega, 2007; Piwowarska, 2010]. Además, se han descrito biosensores enzimáticos [Ndangili, 2011] y genosensores sensibles y selectivos para su determinación [Kim, 2007; Lin, 2012].

La monitorización de estradiol en análisis clínicos se lleva a cabo normalmente mediante la realización de inmunoensayos con diferentes modos de detección. Los radioinmunoensayos [Eriksen, 1981; Mertens, 1983] han sido gradualmente reemplazados, debido al riesgo del uso de radioisótopos, por inmunoensayos con otros métodos de detección, como colorimétricos [Tamate, 1997], quimioluminiscentes [Dancoine, 1997; Xin, 2008] o fluoroinmunoensayos [Majima, 2002].

Se dispone de diversos “kits” ELISA comerciales para la determinación de estradiol. Como puede observarse en la Tabla 11, todos ellos se basan en ensayos competitivos utilizando detección colorimétrica, y la mayoría emplea biorreactivos marcados con peroxidasa. La reacción de inmunocomplejación se monitoriza, como es lo más frecuente en otros casos, mediante la adición de peróxido de hidrógeno seguido del desarrollo del color con TMB. En el inmunoensayo de Abnova, sin embargo, se emplea fosfatasa alcalina como marcador enzimático, utilizándose *p*-nitrofenilfosfato como sustrato. El producto de la reacción genera *p*-nitrofenol cuyo color amarillo permite cuantificar la hormona. Por último, el ensayo de los laboratorios Cayman (ref. 582251) es el más original, ya que emplea un esquema de detección poco habitual en este tipo de inmunoensayos. Se utiliza un conjugado de estradiol y la enzima acetilcolinesterasa (AChE), de modo que la adición de acetilcolina provoca la reacción enzimática generando tiocolina. Este producto reacciona a su vez con el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), DTNB), dando lugar a 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB-) de color amarillo.

Por otro lado, puede verse que los intervalos dinámicos de los calibrados se extienden en márgenes de concentración variables, que pueden abarcar algunas o varias centenas de pg/mL, hasta varios miles de pg/mL. Los límites de detección también oscilan desde unidades o décimas de pg/mL hasta alguna decena. En cuanto a las muestras, cabe destacar la existencia de tres “kits” adecuados para la determinación de estradiol en saliva, además de los habituales, sobre todo para suero y plasma, y solo uno de ellos para orina. Por último, los tiempos de ensayo son largos en general, con periodos que llegan a alcanzar más de cuatro horas. El más rápido requiere 1h 35 min.

Respecto a los inmunosensores, la mayor parte de los encontrados en la bibliografía son electroquímicos (Tabla 12). Draisci y col. desarrollaron primero un dispositivo para el cribado de estradiol en muestras de suero bovino. Tras su extracción con éter dietílico, se llevaba a cabo el ensayo competitivo en placas ELISA convencionales empleando estradiol conjugado con HRP y, una vez que tenían lugar la reacción inmunológica y enzimática, el contenido de cada pocillo se inyectaba en un sistema en flujo [Draisci, 2000]. Posteriormente, el mismo grupo de investigación desarrolló un inmunosensor desechable para la misma aplicación sin realizar una extracción previa del estradiol de la muestra, consiguiendo resultados similares. Este dispositivo implica la inmovilización por adsorción del anticuerpo anti-conejo IgG sobre la superficie de un electrodo serigrafiado. Tras la interacción con el anticuerpo policlonal del estradiol, se llevaba a cabo el inmunoensayo competitivo empleando estradiol marcado con fosfatasa alcalina. El producto de la reacción enzimática, 1-naftol, formado cuando se emplea como sustrato 1-naftilfosfato (1-NP), se detectó mediante voltamperometría diferencial de impulsos [Volpe, 2006]. Un diseño similar fue desarrollado por Pemberton. En esta configuración, el estradiol se determinaba colorimétricamente, empleando *p*-nitrofenilfosfato (NPP) como sustrato enzimático, así como mediante voltamperometría diferencial de impulsos, midiendo la señal de oxidación del 1-naftol formado en la reacción enzimática del naftilfosfato [Pemberton, 2005].

Se ha descrito también un inmunosensor amperométrico basado en la inmovilización de estradiol-6-CMO-BSA (estradiol-6-[O-carboximetil]oxima-BSA) sobre

un electrodo serigrafiado de carbono. El inmunoensayo, de tipo competitivo, se lleva a cabo de dos formas diferentes, bien por incubación posterior en una mezcla de AP-anti-estradiol y estradiol de concentración variable, o bien incubando primero en una mezcla del anticuerpo anti-estradiol y estradiol de concentración variable y, posteriormente, en una disolución de un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina. Estos dispositivos se aplicaron a la determinación de estradiol en muestras de aguas **[Butler, 2006]**. En otra configuración, se inmovilizó estradiol tiolado sobre la superficie de un electrodo de oro. El estradiol tiolado fue sintetizado a partir de estradiol-6-CMO y 2-aminoetanotiol. El inmunoensayo competitivo se llevó a cabo sumergiendo el electrodo modificado en una disolución que contenía una mezcla del anticuerpo y el antígeno. La interacción antígeno-anticuerpo sobre la superficie del electrodo se monitoriza midiendo la disminución de la corriente de oxidación de la hidroquinona como consecuencia del impedimento estérico que ejerce el inmunocomplejo sobre el marcador redox en disolución **[Kuramitz, 2003]**.

En un trabajo posterior, se llevaba a cabo la inmovilización orientada del anti-estradiol sobre la superficie de un electrodo de oro desechable modificado con nanopartículas de oro. Para ello, se modifica previamente el electrodo con proteína G tiolada con N-succinimidil-6-[3'-(2-piridilditio)-propionamido] hexanoato (protein G-LC-SPDP), la cual tiene gran afinidad por la región Fc del anticuerpo. El inmunosensor así preparado se incorpora a una célula de flujo y se lleva a cabo el ensayo competitivo entre estradiol y estradiol-HRP. La medida amperométrica se realiza empleando hidroquinona como mediador enzimático **[Liu, 2009T]**. Este grupo de trabajo empleó la configuración anterior para la determinación de estradiol mediante espectroscopia de impedancia electroquímica y voltamperometría de onda cuadrada **[Liu, 2010b]**.

**Tabla 12.** *Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de Estradiol.*

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, pg/mL	LD, pg/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
ALPCO	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 - 100	0.5	Saliva	2h 15 min
ALPCO 20-ESTHUU-E01	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hasta 200	1.4	Suero, plasma	4h 40 min
R&D systems	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.3 - 3000	4.84	Suero, plasma, cultivos celulares	4h
Abcam ELISA kit ab108667	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 - 2000	8.68	Suero, plasma	3h
Invitrogen ELISA kit KAQ0621	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13 - 935	0.50	Suero	3h 30min
Abnova KA029	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y AP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando <i>p</i> -nitrofenilfosfato	29.3 - 30000	28.5	Saliva, cultivos celulares	2h 45min
Biovondor	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y biotin-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con HRP-Avidin	20 - 3200	10	Suero	1h 35min
Cayman 582251	Inmunoensayo tipo competitivo indirecto entre E2 analito y AChE-E2 con anti-IgG inmovilizado y anti-E2. Detección colorimétrica usando acetilcolina y reactivo de Ellman	6.6 - 4000	19	Plasma, orina	2h - 2h 30min

**Tabla 12.** *Sistemas comerciales (kits) de inmunoensayo para determinación de Estradiol (continuación).*

Sistema de inmunoensayo	Tipo de ensayo y metodología	Intervalo, pg/mL	LD, pg/mL	Muestra	Tiempo de ensayo
Uscn	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y biotin-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con HRP-Avidin	12.35 - 1000	4.75	Suero, plasma, tejidos, cultivos celulares y otros fluidos biológicos	2 h 30 min
Salimetrics	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 - 32	0.1	Saliva	2h 20 min
My Bio Source	Inmunoensayo tipo competitivo directo entre E2 analito y HRP-E2 con anti-E2 inmovilizado. Detección colorimétrica usando TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.8 - 93	0.4	Saliva	3 h 10 min

**Abreviaturas:** **Ab:** anticuerpo; **AChE:** acetilcolinesterasa; **AP:** fosfatasa alcalina; **Avidin:** avidina; **biotin:** biotina; **E2:** estradiol; **HRP:** peroxidasa; **LD:** límite de detección; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

**Tabla 13.** Características analíticas de inmunosensores para la determinación de estradiol.

Configuración y metodología	$E_{det}$ , mV	IL, pg/mL	Pendiente	LD, pg/mL	RSD, %	Tiempo, min	Muestra	Ref.
anti-E2/anti-IgG/SPCE. Inmunoensayo competitivo entre E2 y AP-E2. DPV con 1-NP como sustrato enzimático.	Barrido de 0 a +600	10 - 1000	-0.08 $\mu$ A	15	8.8 - 15.5	147	Suero bovino	Volpe 2006
anti-E2/anti-IgG/SPCE. Inmunoensayo competitivo entre E2 y AP-E2. DPV con 4-NPP como sustrato enzimático.	Barrido de -1 a +700	25 - 500	-0.175 $\mu$ A	50	13.0 - 15.6	160	Suero enriquecido	Pemberton 2005
E2-6-CMO-BSA/SPCEs. Inmunoensayo competitivo directo por inmersión en disolución de AP-anti-E2 + E2. Amperometría con <i>p</i> -APP como sustrato enzimático.	+300	2.44 - 2500	-0.24 $\mu$ A	0.25	3.2 - 10.3	165	Agua	Butler 2006
E2-6-CMO-BSA/SPCEs. Inmunoensayo competitivo indirecto por inmersión en a) disolución de E2 + anti-E2, y b) AP-anti-IgG. Amperometría con <i>p</i> APP como sustrato enzimático.	+300	$6.1 - 2.5 \times 10^4$	-0.23 $\mu$ A	1.25	---	210	Agua	Butler 2006
E2-SH/AuE. DPV con HQ. Ensayo sin marcadores competitivo por inmersión en anti-E2 + E2. DPV usando HQ como mediador redox.	---	$2.7 - 2.7 \times 10^3$ (no-lineal)	---	---	4.1	125	---	Kuramitz 2003
Anti-E2 inmov. sobre AuE modificado con AuNPs y Prot G-SH. Inmunoensayo competitivo entre E2 y HRP-E2. Amperometría con HQ como mediador redox.	-300	hasta 1500	-0.68 $\mu$ A/(pg/mL)	3.5	3.1 - 7.8	120	Suero humano enriquecido	Liu 2009

**Tabla 13.** Características analíticas de inmunosensores para la determinación de estradiol (continuación).

Configuración y metodología	$E_{det}$ , mV	IL, pg/mL	Pendiente	LD, pg/mL	RSD, %	Tiempo, min	Muestra	Ref.
Anti-E2 inmov. sobre AuE modificado con AuNPs tioladas con Prot G. Inmunoensayo competitivo entre E2 y E2-BSA. SWV y EIS con $Fe(CN)_6^{3-/4-}$	Barrido de -50 a +400 (SWV)	18 - 1200 (SWV) 26 - 1000 (EIS)	-3.7 $\mu A/(pg/mL)$ (SWV)	18 (SWV) 26 (EIS)	---	120	---	Liu 2010
E2 sobre GCE modificado con PAMAM-Au/GR-PANI. Inmunoensayo competitivo indirecto empleando HRP-anti-E2-GO. DPV usando HQ como mediador redox.	Barrido de -200 a +500	40 - 7000	---	20	3.5	> 420	Agua y leche	Li 2013

**Abreviaturas:** **1-NP:** 1-naftilfosfato; **4-NPP:** *p*-nitrofenilfosfato; **AP:** fosfatasa alcalina; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **E2:** estradiol; **E2-6-CMO-BSA:** E2-6-[*O*-carboximetil]oxima-BSA; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **GR-PANI:** grafeno-poliánilina; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **pAPP:** *p*-aminofenilfosfato ; **PAMAM-Au:** etilenediamina-poli(amidoamina) con nanopartículas de oro; **SPCE:** electrodo serigrafado de carbono; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **Prot G:** proteína G; **Prot G-SH:** proteína G tiolada.



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentación

4.2. Reactivos

4.3. Disoluciones

4.4. Muestras

4.5. Procedimientos experimentales

4.6. Análisis de muestras



## 4.1. INSTRUMENTACIÓN

### 4.1.1. Aparatos

Las medidas amperométricas y voltamperométricas se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT12 equipado con un software GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System) (Figura 16).



**Figura 16.** Potenciostato utilizado para las medidas amperométricas y voltamperométricas.

Para las medidas de impedancia electroquímica realizadas para el seguimiento de las etapas de modificación de la superficie electródica se empleó un potenciostato  $\mu$ Autolab tipo III, controlado por el software FRA2 (Ecochemie) (Figura 17).



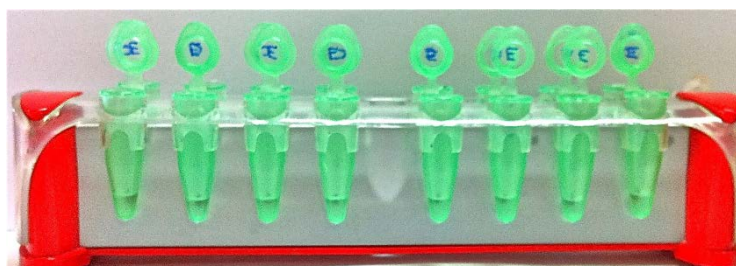
**Figura 17.** Equipo utilizado para las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica.

La caracterización de los materiales y de las superficies electródicas se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) empleando un microscopio JEOL JEM-3000F, microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo (FE-SEM) empleando un microscopio electrónico JEOL

JSM-6335F y mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) usando un Nanoscope IIIa microscopio multimodo (Veeco Instruments Inc., USA).

Otros aparatos utilizados han sido:

- pH-metro de precisión Metrohm Herisau E-510, calibrado de la forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.0, 7.0 y 9.0 a  $25.0 \pm 0.5$  °C.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Incubador Optic Ivymen System provisto de agitación y sistema de control de temperatura (Comecta S.A.)
- Agitador Vortex (Heidolph).
- Agitador magnético P-Selecta Agimatic.
- Imán de neodimio (AIMAN GZ).
- Separador magnético (Dynal MPC-S (nº producto 120.20, Dynal Biotech ASA) (Figura 18).



**Figura 18.** Separador magnético.

- Centrífugas MPW-65R y P-Selecta Cencom.
- Dispositivo para la recolección de muestras de saliva, Salivette (Sarstedt).

### 4.1.2. Electrodo

Las medidas electroquímicas de los magnetoinmunosensores desarrollados se realizaron a temperatura ambiente empleando electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) marca DropSens (Oviedo, España) de referencia DRP-110 (Figura 19) que incluyen, además del electrodo de trabajo de carbono ( $A = 12.56 \text{ mm}^2$ ;  $\phi = 4 \text{ mm}$ ), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata.



**Figura 19.** Electrodo serigrafado de carbono (SPCEs).

Estos electrodos también fueron empleados para la preparación de los inmunosensores para la determinación de estradiol, adiponectina y fibrinógeno.

También se han empleados electrodos serigrafados de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple suministrados por la misma casa comercial de referencia DRP-110CNT.

## 4.2. REACTIVOS

### *Hormonas y proteínas*

Como analitos se emplearon las siguientes hormonas o proteínas: leptina (Lep, 1 mg/mL, Sigma), ceruloplasmina (Cp, 7.14 mg/mL, Abcam), interleucina 6 (IL-6, Abcam), 17  $\beta$ -estradiol (E2, Sigma, 97%), adiponectina (APN, 50  $\mu$ g/mL, Abcam) y fibrinógeno (Fib, Sigma).

Para los estudios de selectividad de los inmunoensayos se utilizaron los siguientes compuestos: ácido úrico, bilirrubina, colesterol, cortisol, creatinina, 17  $\beta$ -estradiol (E2), estriol, hemoglobina (Hb), hormona del crecimiento (hGH), inmunoglobulina G (IgG), progesterona (PROG) y testosterona (TEST), todos ellos de la marca comercial Sigma. También se emplearon: adrenocorticotropina (ACTH, GenWay Biotech), albúmina de suero bovino (BSA) tipo VH (Gerbu), D-Dímero (D-D, Abcam), grelina (AnaSpec), interleucina 8 (IL-8, Abcam), prolactina humana recombinante purificada (PRL, Immunometrics) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ , BD Pharmingen).

***Inmunorreactivos***

Los anticuerpos utilizados para la preparación de los inmunosensores y magnetoinmunosensores fueron:

- *Anti-Lep-biotin*: Anticuerpo policlonal de conejo anti-leptina biotinilado, 1000 µg/mL de LifeSpan.
- *Anti-Lep*: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-leptina, clon 3G1-1C9, 500 µg/mL de Sigma.
- *AP-anti-IgG*: Anticuerpo anti-IgG de ratón Fc específico producido en cabra marcado con fosfatasa alcalina de Sigma.
- *Anti-IL-6*: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-interleucina 6 de Abcam.
- *Biotin-anti-IL-6*: Anticuerpo monoclonal anti-interleucina 6 biotinilado de Abcam.
- *Anti-Cp-biotin*: Anticuerpo policlonal de conejo anti-ceruloplasmina marcado con biotina, 1.1 mg/mL de Abcam.
- *Anti-Cp*: Anticuerpo policlonal de conejo anti-ceruloplasmina, 1.0 mg/mL de Abcam.
- *HRP-anti-IgG*: Anticuerpo anti-IgG de conejo “whole molecule” producido en cabra marcado con HRP de Sigma.
- *Anti-E2-biotin*: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-estradiol biotinilado, 1.9 mg/mL de HyTest.
- *Anti-APN*: Anticuerpo policlonal de ratón anti-adiponectina de Abnova.
- *Biotin-anti-APN*: Anticuerpo policlonal de conejo anti-adiponectina biotinilado, 50 µg/mL de Abcam.
- *HRP-anti-Fib*: Anticuerpo policlonal anti-fibrinógeno marcado con peroxidasa, 900 µg/mL de HyTest.

También se han empleado los siguientes biorreactivos:

- 17 β-estradiol marcado con peroxidasa (HRP-E2, dilución 1:1 fosfato sódico 20 mM, 0.85% NaCl, pH 7.2 : glicerol, CalBioReagents)
- kit ELISA comercial para la determinación de leptina (Abnova KA0649).

- kit ELISA comercial para la determinación de IL-6 (Abcam ab48479).
- kit ELISA comercial para adiponectina (Abcam ab108786).

### ***Micropartículas ferromagnéticas***

Se han empleado partículas magnéticas carboxiladas, HOOC-MBs (Dinabeads<sup>®</sup> carboxiladas, Invitrogen Dynal, 30 mg/mL); partículas magnéticas funcionalizadas con Proteína A, Prot A-MBs (Dinabeads<sup>®</sup> Proteína A, Invitrogen Dynal, 30 mg/mL) y partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, Strept-MBs (Dinabeads<sup>®</sup> estreptavidina, Invitrogen Dynal, 10 mg/mL) para la preparación de los magneto-inmunosensores.

### ***Otros reactivos***

Para la modificación superficial de los electrodos se emplearon nanotubos de carbono de pared doble modificados con ácido *p*-aminobenzoico (DWCNT) y nanocuernos de carbono oxidados (CNH) sintetizados en el Instituto de Nanociencia, Nanotecnología y Materiales Moleculares (INAMOL).

Para la modificación de los electrodos mediante la técnica del *grafting*: ácido *p*-aminobenzoico (*p*ABA, Acros), perclorato de litio (Sigma) y etanol (Panreac).

Para la activación de grupos carboxílicos: clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma y Acros), *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHSS, Sigma y Acros) y Mix&Go<sup>™</sup> (Anteo Diagnostics).

Otros reactivos utilizados en la preparación de los inmunosensores fueron: estreptavidina (Gerbu, 17.6 unidades de biotina/mg), BSA (Gerbu, tipo VH), caseína (Sigma), leche comercial, etanolamina (Sigma), D-biotina (Gerbu), kit de conjugación con fosfatasa alcalina (Abcam), estreptavidina marcada con HRP, HRP-Strept (Abcam) y polímero de estreptavidina marcado con HRP, Poli-HRP-Strept (Pierce Thermo Scientific).

Las disoluciones reguladoras de pH se prepararon a partir de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Scharlau, 99%), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Scharlau, 99%), EDTA (Panreac), MgCl<sub>2</sub> (Panreac, 99%), Trizma<sup>®</sup> (tris(hidroximetil)-aminometano, Sigma, 99%), Tween<sup>®</sup>

20 (Aldrich), Tris-HCl (clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano, Scharlau, 99%), MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, NaCl (Scharlau, 99%) y KCl (Scharlau, 99%).

Otros reactivos empleados fueron: peróxido de hidrógeno (Aldrich, 30% (w/w)), hidroquinona (Sigma), hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado (Sigma, 98.5-102.0%), hexacianoferrato (III) de potasio (Sigma, 99.4%), 1-naftilfosfato (sal monosódica monohidratada, 1-NPP, Sigma), etanol (Panreac), metanol calidad HPLC (Scharlau) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, NEOGEN).

Todos los productos fueron reactivos de grado analítico y el agua utilizada fue obtenida de un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

### 4.3. DISOLUCIONES

#### ***Disoluciones reguladoras:***

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (PBS) de diferentes concentraciones y pH.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$  (PBS') de diferentes concentraciones y pH.
- PBS 0.1 M de pH 7.4 y 8.2 + Tween 20 al 0.05% (PBST).
- PBS' 10 mM + KCl 2.7 mM + Tween 20 al 0.05% de pH 7.4 y 8.2 (PBST').
- Trizma 0.1 M +  $\text{MgCl}_2$  1 mM de pH 9.0 (Trizma).
- Tris-HCl 100 mM de pH 7.2 (Tris-HCl).
- Tris-HCl 10 mM de pH 7.4 + 2 mM NaCl + 1 mM EDTA (Tris-washing).
- Tris-HCl 5 mM de pH 7.4 + 1 M NaCl + 0.5 mM EDTA (Tris-coating).
- Tris-HCl 50 mM de pH 7.4 + 140 mM NaCl + 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (Tris-binding).

#### ***Disoluciones de anticuerpos y antígenos:***

- Para la preparación de *disoluciones de IL-6, biotin-anti-IL-6, HRP-Strept, Poli-HRP-Strept, anti-E2-biotin, HRP-E2, APN, biotin-anti-APN, Fib y HRP-anti-Fib* se empleó PBS 0.05 M ó 0.1 M de pH 7.4.
- La *disolución de anti-Lep-biotin* se prepara en regulador Tris-coating.
- Para las *disoluciones de Lep, anti-Lep y AP-anti-IgG* se emplea el regulador Tris-binding conteniendo 0, 5 y 2 % de BSA, respectivamente.
- Las *disoluciones de Cp, anti-Cp-biotin y anti-Cp* se preparan empleando el regulador PBST' 0.1 M de pH 7.4 y 8.2, respectivamente.

- Las disoluciones de anti-Cp y HRP-anti-IgG se preparan empleando el regulador PBS' 0.1 M de pH 7.4.
- Para las disoluciones de Cp y AP-Cp se emplea el medio Tris-HCl.
- Las disoluciones de anti-IL-6, Cp, anti-APN y Fib se preparan en regulador MES 25 mM de pH 5.0.

#### **Otras disoluciones**

Las hormonas cortisol, estradiol, estriol y testosterona se preparan por disolución de 1 mg del compuesto en 1 mL de metanol. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón PBS(') o PBST(') de pH 7.4 o en Tris-HCl. Las disoluciones de ácido úrico, bilirrubina, BSA, creatinina, D-dímero, grelina, hemoglobina, hormona del crecimiento, inmunoglobulina, progesterona, prolactina y TNF $\alpha$  de concentración variable se preparan en tampón PBS(') o PBST(') de pH 7.4 o en Tris-HCl.

#### **Disoluciones para la modificación y activación del electrodo de trabajo y de las partículas magnéticas carboxiladas:**

- *Disolución ácido p-aminobenzoico 3 mM/LiClO<sub>4</sub> 0.1 M:* se disuelven 4.4 mg y 0.106 g, respectivamente, en 10 mL de etanol.

- *Suspensión de DWCNT 0.5 mg/mL:* se toma 1 mg de DWCNT en un vial y se diluye en 2 mL de agua. Posteriormente y se añaden 27.4  $\mu$ L de Tween 20 y se introduce en el baño de ultrasonidos durante 90 minutos.

- *Suspensión de CNH oxidados 0.5 mg/mL:* se pesa 1 mg de CNH oxidados, se añaden 2 mL de agua y se sonica la suspensión durante 60 min.

- *Disolución EDC/NHSS 0.1 M ó 25 mg/mL:* se pesan las cantidades necesarias de ambas sustancias para obtener una concentración de 0.1 M ó 25 mg/mL y se disuelven en tampón MES de pH 5.0 ó 6.0.

- *Disoluciones de caseína al 1 y 2%:* se preparan a partir de caseína al 5% en KOH 0.1 M por dilución con PBS(').

- *Disolución de etanolamina 1 M:* Se añaden 30  $\mu$ L de etanolamina a 470  $\mu$ L de PBS 0.1 M de pH 8.0.

### **Disoluciones de medida**

- *Hidroquinona 1 mM*: se pesan 11 mg y se disuelven en PBS 0.05M de pH 6 (PBS de medida). Posteriormente se hace una dilución 1/100 en el mismo medio.

- *Peróxido de hidrógeno 50 mM*: se diluyen 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial en 1 mL en el tampón de medida y seguidamente se diluye 10 veces con la misma disolución reguladora.

- *1-Naftilfosfato 0.05 M*: se pesa la cantidad necesaria de producto y se disuelve en regulador Trizma.

- *Ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico 5 mM*: la disolución se prepara pesando las cantidades adecuadas de cada uno de los productos y disolviendo con una disolución de KCl 0.1 M.

- *Ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico 1 mM*: se disuelve la cantidad necesaria de cada uno de ellos en regulador PBS 0.1 M de pH 7.4.

- *Ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico 1 mM en KCl 0.1 M*: se disuelve la cantidad necesaria de cada uno de los productos en medio KCl 0.1 M y se ajusta el pH a 3.0.

## **4.4. MUESTRAS**

Para la validación de los métodos desarrollados se analizaron diferentes muestras de suero y plasma: suero humano liofilizado (Sigma, S-7397), muestras de suero humano de pacientes sanos de hombre y mujer (Abyntek, SG610-2 y SG609-2, respectivamente), suero humano certificado BCR-577 (Sigma) conteniendo 188 pg/mL de estradiol, y plasma certificado liofilizado (NIBSC) que contiene 2.7 mg/mL de fibrinógeno.

Las muestras de leche utilizadas fueron leche en polvo para lactantes (Blemil Plus 1 Forte) y leche materna procedente de dos mujeres, ambas con dos meses de lactancia.

Se analizó una muestra de orina certificada (BioRad, Liquichek Urine Chemistry Control de BioRad, nivel 1, 63221).

Las muestras de saliva proceden de tres voluntarios (fumador, no fumador y paciente con periodontitis).

## **4.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

### **4.5.1. Preparación de los inmunosensores basados en micropartículas magnéticas funcionalizadas**

#### **4.5.1.1. Magnetoinmunosensor para la determinación de leptina**

En primer lugar, se adicionan 2  $\mu\text{L}$  de la suspensión de partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lava dos veces con la disolución Tris-washing. Seguidamente se separan las partículas imantando durante dos minutos, se desecha el sobrenadante y se añaden 50  $\mu\text{L}$  de disolución de anti-Lep-biotin de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-coating y se incuba durante 45 minutos a 37°C y 950 rpm. Después, se lava 2 veces con disolución Tris-washing, se imanta nuevamente, se desecha el sobrenadante y se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de biotina 2050  $\mu\text{M}$  en Tris-binding y se deja 30 minutos en un incubador provisto de agitación a 37°C, para bloquear los sitios de unión libres de la estreptavidina. A continuación se lava 2 veces con Tris-washing y se añaden 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de leptina de concentración variable en Tris-binding en presencia de BSA al 5% y se incuba durante 45 min. Posteriormente, se realizan 2 lavados con Tris-washing y se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de anti-Lep 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-binding con 5% de BSA y se incuba durante 45 min, después se lava dos veces con disolución Tris-washing y se añaden 50  $\mu\text{L}$  de una disolución 1/1000 de AP-anti-IgG en Tris-binding con un 2% de BSA y se incuba 45 min.

Finalmente, el conjugado AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs se resuspende en 45  $\mu\text{L}$  de Trizma pH 9.0 e inmediatamente antes de la medida, se inmoviliza sobre un SPCE colocado en posición horizontal con ayuda de un imán de neodimio colocado debajo del mismo, de forma que las MBs queden dispuestas de forma reproducible sobre la superficie de trabajo, evitando variaciones en el espesor de la capa de conjugado o en el área recubierta del electrodo. La determinación de leptina se realiza por adición de 5  $\mu\text{L}$  de disolución de 1-naftilfosfato 50 mM (concentración de 1-naftilfosfato sobre el electrodo 5 mM) y medida de la respuesta

voltamperométrica, después de un tiempo de espera de 5 minutos, mediante DPV en el intervalo de potencial de -0.15 a 0.6 V.

#### **4.5.1.2. Magnetoimmunosensor para la determinación de interleucina 6**

En primer lugar se transfieren 3  $\mu\text{L}$  de la suspensión de partículas magnéticas carboxiladas a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lava dos veces con 50  $\mu\text{L}$  de la disolución MES de pH 5.0 durante 10 minutos. Seguidamente se separan las partículas imantando durante cuatro minutos, se desecha el sobrenadante y se añaden 25  $\mu\text{L}$  de disolución de EDC/NHSS de 25 mg/mL en MES de pH 5.0 incubándose durante 35 minutos a 25°C agitando a 600 rpm.

Después, se lava dos veces con 50  $\mu\text{L}$  de disolución MES de pH 5.0, se imanta nuevamente, se desecha el sobrenadante y se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de la disolución de anti-IL-6 dilución 1/75 en PBS 7.4 y se deja reaccionar durante 30 minutos con agitación a 25°C.

La siguiente etapa consiste en el bloqueo de los grupos activados que han quedado libres de anticuerpo. Para ello el conjugado anti-IL-6/HOOC-MBs se incuba con 25  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1 M en PBS de pH 8.0 durante 1 hora. El exceso de etanolamina se elimina con ayuda del imán y se realizan 2 lavados con 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl de pH 7.2. A continuación se añaden 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de IL-6 de concentración variable y se incuba durante 30 min a 25°C. Posteriormente, se realizan 2 lavados con PBST de pH 7.4. Una vez lavadas, se incuban en una disolución del anticuerpo biotinilado biotin-anti-IL-6 1/250 en PBS de pH 7.4 durante 30 min a 25°C. Pasado ese tiempo, se lavan 2 veces con PBST 7.4, se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept de dilución 1/3000 en PBS 7.4 y se deja reaccionar durante 30 min agitando en incubador a 25°C. Por último, para eliminar el reactivo marcado sobrante se realizan 3 lavados con PBST de pH 7.4.

Para mejorar la sensibilidad del inmunosensor, se sustituye la HRP-Strept por un polímero de estreptavidina marcado con HRP. Para ello una vez obtenido el conjugado biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs se incuba en una disolución que contiene Poli-HRP-Strept de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio PBS de pH 7.4 y se deja reaccionar

durante 30 min a 25°C con agitación a 600 rpm. Finalmente, para eliminar el exceso de reactivo marcado se realizan 3 lavados con PBST de pH 7.4

Una vez preparado el inmunoconjugado completo, éste puede atraparse sobre la superficie del electrodo con ayuda de un pequeño imán situado debajo del mismo. Para ello, se resuspende el conjugado Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs o HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs en un volumen de 45 µL de hidroquinona 1 mM en medio PBS de pH 6.0 y se transfiere a la superficie de un SPCE. La medida se realiza aplicando un potencial de -0.2 V y, una vez estabilizada la señal, se adicionan 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM, preparada en el mismo regulador y se mide la corriente generada por la reacción enzimática 200 segundos después de la adición.

#### **4.5.1.3. Magnetoinmunosensores para la determinación de ceruloplasmina**

##### ***Marcaje de Ceruloplasmina con AP***

El marcaje de ceruloplasmina con fosfatasa alcalina se realiza empleando el kit de conjugación EasyLink Alkaline Phosphatase Conjugation Kit (3 x 100 µg AP).

El kit viene preparado para marcar 100 µg de proteína. En las especificaciones del producto se recomienda que la concentración de proteína a marcar esté comprendida entre 1 y 4 mg/mL y el volumen de disolución comprendido entre 40 y 100 µL, por lo que para obtener 100 µg de ceruloplasmina marcada se utilizan 7 eppendorf que contienen cada uno 2 µL de ceruloplasmina 7.14 mg/mL y se diluye con 36 µL de agua obteniéndose 50 µL de ceruloplasmina marcada de concentración igual a 2 mg/mL.

Protocolo:

- 1) Se añaden 5 µL de EL-Modifier reagent sobre la disolución de ceruloplasmina.
- 2) La disolución resultante se adiciona sobre el vial de EL-AP mix y con la micropipeta se disuelve.
- 3) Se deja reaccionar durante 3 h a 25°C

4) Finalmente se añaden 5  $\mu\text{L}$  de EL-quencher y después de 30 minutos el conjugado puede ser utilizado.

5) Para la conservación se añaden 50  $\mu\text{L}$  de glicerol (obteniéndose AP-Cp de 1 mg/mL en 50% glicerol)

#### ***Magnetoinmunosensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs***

Se adicionan 3  $\mu\text{L}$  de la suspensión de partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (10 mg/mL) a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lava dos veces con la disolución PBST' 7.4 (se han utilizado disoluciones reguladoras en ausencia de ion sodio, tal y como indica la casa comercial suministradora para evitar la posible precipitación de la proteína). Seguidamente, se separan las partículas imantando durante dos minutos, se desecha el sobrenadante y se añaden 25  $\mu\text{L}$  de disolución de anti-Cp-biotin de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBST' 7.4, dejando incubar durante 15 minutos a 25°C y 950 rpm. Después, se lava 1 vez con disolución PBST' 7.4, se imanta nuevamente, se desecha el sobrenadante y se lava con disolución Tris-HCl.

Para realizar el inmunoensayo de tipo competitivo, las partículas modificadas con anti-ceruloplasmina se resuspenden en 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de ceruloplasmina de concentración variable y AP-Cp de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-HCl en BSA 2% y se incuban a 25°C durante 30 minutos en un incubador provisto de agitación, estableciéndose una competencia entre la ceruloplasmina libre y la ceruloplasmina marcada por los sitios de unión del anticuerpo. Después, el conjugado AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs se lava tres veces con disolución Tris-HCl para eliminar las especies no enlazadas y se resuspende en 45  $\mu\text{L}$  de regulador Trizma. Por último, para la realización de la medida, la suspensión del conjugado anterior se inmoviliza sobre un SPCE con ayuda del imán, se adicionan 5  $\mu\text{L}$  de 1-naftilfosfato 50 mM y se mide la respuesta voltamperométrica en diferencial de impulsos en el intervalo de potencial de -0.15 a 0.6 V después de un tiempo de espera de cinco minutos.

#### ***Magnetoinmunosensor anti-Cp/Prot A-MBs***

En primer lugar, a un tubo eppendorf de 1.5 mL se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de la suspensión de partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A (30 mg/mL), de forma que la concentración de partículas sea la misma que la empleada en el inmunosensor anterior y se lava dos veces con la disolución PBST' 8.2. Seguidamente

se separan las partículas imantando durante dos minutos y se desecha el sobrenadante y se añaden 25  $\mu\text{L}$  de disolución de anti-ceruloplasmina (anti-Cp) de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBST' 8.2 y se incuba durante 15 minutos a 25°C y 950 rpm.

Después, se lava 1 vez con disolución PBST' 8.2, se imanta nuevamente, se desecha el sobrenadante y se lava con disolución Tris-HCl. Posteriormente se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de Cp de concentración variable y AP-Cp (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en Tris-HCl y se deja 30 minutos en un incubador provisto de agitación, a 25°C. El conjugado AP-Cp/Cp/anti-Cp/Prot A-MBs se lava tres veces con disolución Tris-HCl.

La señal voltamperométrica se obtiene siguiendo el mismo procedimiento empleado en el magnetoinmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs anterior.

#### **4.5.2. Preparación del inmunosensor basado en *grafting* sobre un electrodo serigrafiado de carbono**

##### **4.5.2.1. Inmunosensor para la determinación de estradiol**

###### ***Modificación del electrodo serigrafiado de carbono con ácido *p*-aminobenzoico (pABA) y estreptavidina***

La modificación de los electrodos serigrafiados de carbono con *p*ABA se realiza en tres etapas: 1º) la oxidación electroquímica de una amina aromática sobre la superficie de un electrodo de carbono da lugar a la formación del catión radical amino y su unión a la superficie electródica por formación del enlace carbono-nitrógeno. Para ello, se sumerge el electrodo serigrafiado de carbono en una mezcla ácido *p*-aminobenzoico (3 mM) y perclorato de litio (0.1 M) en etanol y se realizan 3 barridos mediante voltamperometría cíclica en el intervalo de 0 a 1 V a 10 mV/s [Liu 2000L]. Seguidamente, los electrodos modificados se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire. 2º) Activación de los grupos carboxilo superficiales. Para ello, se deposita sobre su superficie un volumen 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de EDC/NHSS 0.1 M de cada uno de ellos en MES 0.05 M de pH 6.0, y se deja durante 30 minutos. 3º) La tercera etapa consiste en la modificación con estreptavidina, para lo cual se depositan sobre los electrodos 10  $\mu\text{L}$  de disolución de Strept 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en agua y se dejan al aire hasta que se evapore el disolvente (aproximadamente 60 minutos).

### ***Preparación del inmunosensor anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE y realización del inmunoensayo***

La inmovilización del anticuerpo se realiza por incubación del electrodo modificado con estreptavidina obtenido en el apartado anterior en una disolución de anti-E2-biotin 30 µg/mL durante 15 minutos. Para evitar adsorciones inespecíficas fue necesario incluir una etapa de bloqueo, empleando para ello una mezcla de BSA 5% y biotina 3 mM que se deja sobre la superficie del electrodo durante un tiempo de 40 minutos.

El inmunoensayo, de tipo competitivo, se lleva a cabo depositando sobre la superficie electródica un volumen de 10 µL de una disolución mezcla de estradiol de concentración variable y E2-HRP (1/1000) y BSA 2% PBS 0.05 M de pH 7.4 durante 45 minutos a 8°C. Entre cada etapa se realiza un lavado del electrodo con agua Milli-Q.

Para la obtención de los amperogramas se depositan 45 µL de una disolución de HQ 1 mM y se registra la corriente obtenida cuando se aplica un potencial de -200 mV. Cuando la corriente de fondo se estabiliza, después de unos 100 segundos, se adiciona una alícuota de 5 µL de una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM, midiendo la corriente al cabo de 200 segundos de reacción enzimática.

## **4.5.3. Preparación de inmunosensores basados en electrodos modificados con nanomateriales de carbono**

### **4.5.3.1. Inmunosensor para la determinación de ceruloplasmina**

Primeramente, se activan los grupos carboxilo de los nanotubos presentes en la superficie del electrodo de trabajo del SPCE incubando en 10 µL de mezcla EDC/NHSS de concentración 0.1 M en medio regulador MES 25 mM de pH 5.0 durante media hora. Después se depositan 10 µL de ceruloplasmina 30 µg/mL preparada en el mismo regulador, incubando hasta sequedad a 25°C. A continuación se bloqueó la superficie del electrodo por adición de 10 µL de caseína al 2% preparada en PBS' 0.1 M de pH 7.4, durante 45 minutos.

La configuración del inmunosensor diseñado en este trabajo responde al esquema de inmunoensayo competitivo indirecto en dos pasos. Para su desarrollo, primero se prepara una mezcla de anti-Cp 2.5 µg/mL y Cp patrón o la muestra en

medio PBS' 0.1 M de pH 7.4, agitando a 4°C durante 20 min, con el fin de lograr que tenga lugar la unión antígeno-anticuerpo. Después se depositaron 10 µL de esta mezcla sobre la superficie del electrodo Cp/MWCNT-SPCE, dejando incubar durante 30 minutos.

Para la obtención de la respuesta electroquímica se inmoviliza sobre el conjugado anterior 10 µL de HRP-anti-IgG en dilución 1/750, preparada en medio PBS' 0.1 M de pH 7.4 y se incuba durante 45 minutos. Entre cada etapa se lava con disolución PBST' y agua Milli-Q. La determinación de Cp se realiza del mismo modo que el descrito en el inmunosensor de estradiol.

#### **4.5.3.2. Inmunosensor para la determinación de adiponectina**

Se prepara una suspensión acuosa de nanotubos de carbono de pared doble modificados con *p*ABA (DWCNT). Para ello, se toma 1 mg de DWCNT en 2 mL de agua en un vial, se añaden 27.4 µL de Tween 20 y se deja la disolución en el baño de ultrasonidos durante 90 minutos. Una vez que la disolución esté homogenizada, se toma una alícuota de 1 µL y se deposita sobre la superficie electródica y se deja secar. Esta operación se repite tres veces hasta inmovilizar 3 µL de suspensión de DWCNTs.

A continuación se activa la superficie electródica, depositando 3 µL de Mix&Go y, tras un tiempo de 60 minutos, se lava con agua y se deja secar. Seguidamente se inmoviliza el anticuerpo de captura. Para ello, se depositan 5 µL de una dilución 1/75 en MES y se incuba durante 60 min. Después se lava con agua y se deja secar al aire. El bloqueo de la superficie electródica se lleva a cabo depositando 5 µL de la disolución de BSA al 5% durante 30 minutos. Al igual que anteriormente, después se lava con agua y se deja secar.

Seguidamente se añaden 5 µL de la disolución de adiponectina (APN) sobre el electrodo de trabajo y se incuba durante 60 minutos. Posteriormente se lava con agua, se deja secar y se depositan 5 µL de disolución del anticuerpo biotinilado, biotin-anti-APN, 2 µg/mL y, tras 15 minutos y un lavado con agua, se añaden 5 µL de la disolución de HRP-Strept al electrodo de trabajo y se dejan durante 15 minutos. Finalmente, se lava y se añaden 10 µL de tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 hasta que se realiza la medida amperométrica del modo descrito en el inmunosensor de estradiol.

#### **4.5.3.3. Inmunosensor para la determinación de fibrinógeno**

En primer lugar, se modifica la superficie electródica con 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión de nanocuernos de carbono oxidados de 0.5 mg/mL. Tras la evaporación del agua, se activan los grupos carboxílicos empleando una disolución de EDC/NHSS 0.1 M en MES 25 mM de pH 5.0. A continuación, se inmoviliza el fibrinógeno depositando 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y dejando al aire hasta la evaporación del disolvente. Después se lava la superficie con agua, se deja secar nuevamente y se procede al bloqueo de la superficie electródica para evitar adsorciones inespecíficas incubando en 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de leche semidesnatada al 25% en PBS 7.4 durante 30 minutos.

Una vez preparado el inmunosensor, se llevó a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo indirecto, en el que el antígeno libre y el antígeno inmovilizado compiten por los sitios de unión del HRP-anti-Fib. Para ello se depositan sobre el electrodo 10  $\mu\text{L}$  de una disolución que contiene 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de HRP-anti-Fib y Fib de concentración variable y después de 30 min se lava la superficie con agua destilada.

La determinación de fibrinógeno se lleva a cabo amperométricamente, siguiendo el procedimiento experimental empleado en el inmunosensor de estradiol y registrando la corriente obtenida a un potencial aplicado de -50 mV.

### **4.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS**

#### **4.6.1. Determinación de leptina en suero humano, leche en polvo y leche materna con el magnetoinmunosensor AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs**

##### ***Suero***

El suero empleado se presenta en forma liofilizada y se conserva a 4°C. Se reconstituye con 1 mL de Tris-binding en 5% de BSA y se mezcla mediante agitación suave. Después se contamina con concentraciones variables de leptina, 5, 25, 50 y 100 ng/mL y se diluye 1000 veces con disolución Tris-binding en presencia de 5% de BSA para que las concentraciones finales se encuentren dentro del intervalo lineal (5, 25, 50 y 100 pg/mL). Tras comprobar la ausencia de efecto matriz, la determinación de

leptina se lleva a cabo mediante interpolación de las señales obtenidas en el calibrado de patrones.

#### ***Leche Blemil plus 1 forte***

Se disuelven 150 mg de leche en polvo en 1 mL de agua Milli-Q a 40°C, según se indica en las instrucciones del producto comercial. Seguidamente, la disolución se sumerge en un baño de ultrasonidos 8 veces durante 10 segundos, agitando la disolución manualmente entre las inmersiones. A continuación se centrifuga la leche a 2000 rpm durante 20 min a 4°C con el fin de separar la nata [Ilcol 2006]. La leche desnatada se contamina con leptina en concentraciones de 1 y 7 ng/mL y se hacen diluciones 1:100 y 3:1000, respectivamente, empleando disolución Tris-binding en presencia de 5% de BSA. De esta manera, se obtienen concentraciones finales de 10 y 21 pg/mL, respectivamente. Con el fin de evaluar la existencia de efecto matriz se realizan adiciones de disolución de leptina patrón, obteniéndose incrementos de concentración de 0, 25, 50 y 75 pg/mL, de tal forma que para las concentraciones iniciales de 1 y 7 ng/mL, las concentraciones finales que se obtienen son 10, 35, 60 y 85 pg/mL y 21, 46, 71 y 96 pg/mL, respectivamente.

A partir de las concentraciones obtenidas mediante interpolación de las señales en el calibrado de patrones y, una vez sustraída la concentración correspondiente a la adición estándar realizada, se obtiene la concentración de leptina en la muestra de leche contaminada.

#### ***Leche materna***

La leche materna se somete al tratamiento de ultrasonidos indicado anteriormente, con el fin de liberar la leptina contenida en los adipocitos por la rotura de éstos. Posteriormente se centrifuga tal y como se describe para la muestra de leche en polvo Blemil. Seguidamente la leche, ya desnatada, se diluye 100 veces con disolución Tris-binding en presencia de 5% de BSA. Si se tiene en cuenta que la concentración de leptina en leche materna está comprendida entre 0.11 y 5.0 ng/mL [Ilcol 2006], tras la dilución de la muestra, el intervalo de concentración será de 1.1 a 50 pg/mL. Para aplicar el método de adiciones estándar se realizan adiciones de disolución patrón de leptina de forma que las disoluciones de medida incrementen su concentración de leptina en 0, 25, 50 y 75 pg/mL de Lep patrón en Tris-binding con 5%

de BSA. La inexistencia de efecto matriz comprobada por comparación de la pendiente obtenida con la del calibrado de patrones, permite la determinación de leptina en la muestra mediante interpolación de la señal en el calibrado de patrones.

#### **4.6.2. Determinación de interleucina 6 en orina y saliva con el magneto-inmunosensor Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs**

##### ***Orina***

Para la determinación de IL-6 en la muestra de orina se empleó un control químico de orina que contiene amilasa, calcio, cloruro, cortisol, creatinina, glucosa, magnesio, microalbúmina (albúmina), fósforo, potasio, sodio, urea, urea nitrogenada y ácido úrico. Las muestras de orina contaminadas con 15, 30 y 60 pg/mL de IL-6 se analizan previo ajuste del pH a 7.4 por adición de  $K_2HPO_4$ .

##### ***Saliva***

Se analizaron muestras de saliva correspondientes a un paciente de periodontitis, un fumador y un voluntario no fumador.

Considerando la complejidad de las muestras se evaluó la existencia de efecto matriz, calculando la pendiente obtenida al construir un calibrado por adición de cantidades conocidas de una disolución patrón de interleucina 6 en el intervalo comprendido entre 25 y 200 pg/mL. Tras comprobar la ausencia de efecto matriz, las muestras fueron analizadas sin necesidad de ningún tipo de pretratamiento, por interpolación directa en el calibrado externo.

#### **4.6.3. Determinación de ceruloplasmina en suero empleando el magnetoinmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs**

##### ***Suero***

La muestra empleada es un suero humano deficiente en progesterona que se presenta en forma liofilizada y se conserva a 4°C. Su reconstitución se realiza adicionando 1 mL de Tris-HCl pH 7.2 mediante agitación suave. Seguidamente se toma una alícuota de la muestra reconstituida y se contamina con ceruloplasmina patrón de forma que la concentración en la muestra sea de 1000 µg/mL de Cp, a partir de la cual

se preparan disoluciones más diluidas (50, 100, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cp) usando el suero reconstituido como diluyente. Posteriormente, se realiza una dilución 1/500 con Tris-HCl y, finalmente, se añade un volumen igual de disolución de AP-Cp 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-HCl. La dilución final de la muestra de suero, 1/1000, permite llevar a cabo la determinación de Cp en la muestra por interpolación en el calibrado externo debido a la minimización del efecto matriz.

#### **4.6.4. Determinación de estradiol en suero y orina con el inmunosensor E2-HRP+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE**

##### ***Suero***

La muestra de suero certificado se reconstituye en 1 mL de agua destilada y se agita suavemente hasta su total disolución, siendo la concentración de estradiol de 188  $\text{pg}/\text{mL}$ . La muestra se almacena a  $-40^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ . Seguidamente se toma una alícuota y se realizan distintas diluciones con PBS 0.05 M de pH 7.4 para preparar disoluciones con concentraciones de estradiol de 2.5, 10.5, 21, 63 y 94  $\text{pg}/\text{mL}$ . La determinación de estradiol se lleva a cabo sin necesidad de aplicar ningún tipo de pretratamiento a la muestra suero.

##### ***Orina***

La muestra de orina contaminadas con 20, 50 y 100  $\text{pg}/\text{mL}$  de estradiol se analizan directamente, sin necesidad de ningún pretratamiento de la muestra.

#### **4.6.5. Determinación de ceruloplasmina en suero y orina empleando el inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp/Cp/MWCNT-SPCE**

##### ***Suero***

El suero certificado empleado fue el utilizado en la determinación de ceruloplasmina empleando el magnetoinmunosensor AP-Cp/Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs. En este caso, la muestra se reconstituye con 1 mL de PBS' de pH 7.4 y se contamina con diferentes concentraciones de ceruloplasmina, 1, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que son inferiores a los niveles normales en individuos sanos. Finalmente, se diluye adicionando un volumen igual de disolución de anti-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS'.

### ***Orina***

La orina enriquecida con concentraciones variables de ceruloplasmina, 0.08, 0.5 y 1.0 µg/mL, se analiza previo ajuste del pH a 7.4 por adición de fosfato ácido de potasio y tras adicionar un pequeño volumen de disolución patrón de anti-Cp en PBS' de forma que su concentración final sea de 2.5 µg/mL.

## **4.6.6. Determinación de adiponectina en suero con el inmunosensor HRP-Strept/biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE**

### ***Suero***

Las muestras empleadas son suero humano de pacientes sanos de ambos sexos. La determinación de adiponectina empleando el inmunosensor desarrollado se realiza por interpolación de la señal obtenida para la muestra, tras una dilución 1/50 en PBS de pH 7.4, en el calibrado de patrones.

## **4.6.7. Determinación de fibrinógeno en plasma y orina con el inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE**

### ***Plasma***

Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial suministradora de la muestra de plasma certificado, el contenido total de la ampolla se reconstituye con 1 mL de agua desionizada a temperatura ambiente, agitando suavemente para evitar la formación de espumas y hasta la total disolución. La concentración de fibrinógeno presente en la muestra reconstituida es de 2.7 mg/mL.

Seguidamente, se trasvasa a un tubo de plástico y se toman alícuotas con el fin de preparar disoluciones más diluidas, de 1, 5 y 10 µg/mL de Fib con PBS 7.4. Tras comprobar la ausencia de efecto matriz, las muestras fueron analizadas, sin necesidad de ningún pretratamiento, por interpolación directa en el calibrado de patrones.

### ***Orina***

La muestra de orina se contamina con concentraciones variables de fibrinógeno de 0.65, 5 y 25 µg/mL y, tras el ajuste del pH a 7.4 por adición de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, se analizan sin necesidad de otro tipo de pretratamiento.

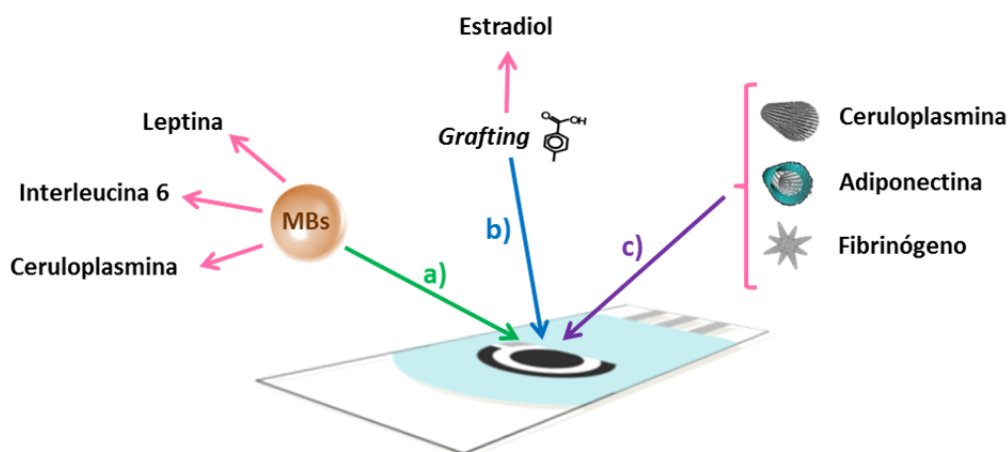
## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

- 5.1. Inmunosensores electroquímicos basados en micropartículas magnéticas funcionalizadas
  - 5.1.1. Magnetoimmunosensor para leptina
  - 5.1.2. Magnetoimmunosensor para interleucina 6
  - 5.1.3. Magnetoimmunosensores para ceruloplasmina
  
- 5.2. Inmunosensor electroquímico basados en la modificación de la superficie electródica por *grafting*
  - 5.2.1. Inmunosensor para estradiol
  
- 5.3. Inmunosensores electroquímicos basados en la modificación de la superficie electródica con nanomateriales de carbono
  - 5.3.1. Inmunosensor para ceruloplasmina empleando nanotubos de carbono de pared múltiple
  - 5.3.2. Inmunosensor para adiponectina empleando nanotubos de carbono de pared doble
  - 5.3.3. Inmunosensor para fibrinógeno empleando nanocuernos de carbono



Siguiendo los objetivos presentados anteriormente, en esta Tesis Doctoral se han preparado varios inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de obesidad y enfermedades relacionadas. Para ello se han construido plataformas electrónicas originales, modificadas con micro- y nanomateriales, adecuadas para la inmovilización estable y eficaz de biomoléculas y para la obtención de respuestas electroquímicas sensibles y reproducibles. Por otro lado, se han seleccionado varias moléculas de importancia demostrada en el ámbito de estas patologías, con el fin de aplicar las superficies desarrolladas a su determinación en muestras clínicas.

En esta parte de la Memoria se ha pretendido mostrar los resultados obtenidos del modo más sistemático y claro posible. Para ello, se ha optado por organizar el trabajo de acuerdo con el tipo de material empleado para la inmovilización de las biomoléculas y la obtención de las respuestas electroquímicas. De este modo, el esquema de la presentación es el mostrado al final de este párrafo (Figura 20). Como se ha comentado anteriormente, en todas las configuraciones desarrolladas se han utilizado electrodos serigrafados de carbono como plataforma base. Como se puede observar, a) sobre éstos se han inmovilizado micropartículas magnéticas funcionalizadas con diferentes grupos enlazantes, dando lugar a cuatro configuraciones; b) se han utilizado directamente modificando su superficie mediante “grafting”, preparándose así un inmunosensor para estradiol, o c) han sido previamente nanoestructurados, dando lugar a otras tres configuraciones basadas en diferentes estrategias.

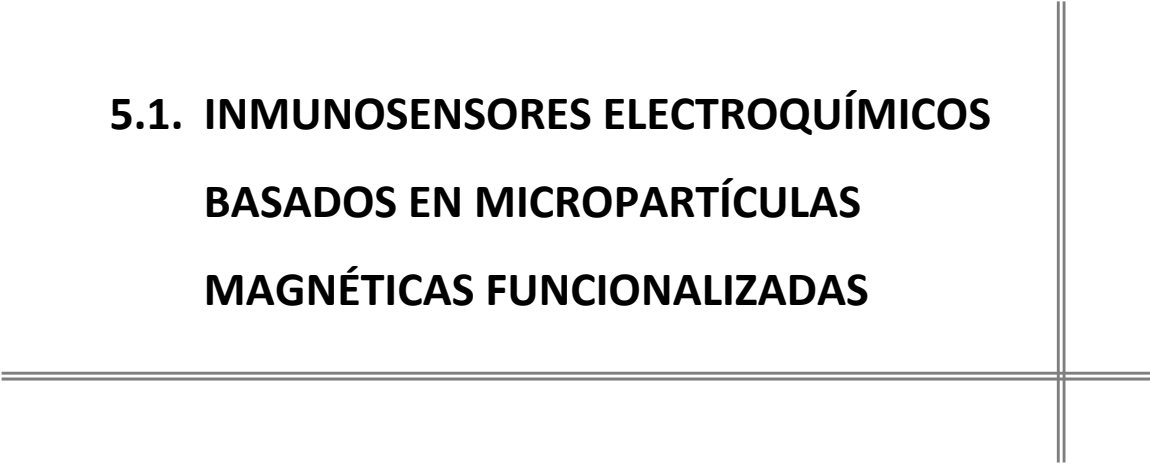


**Figura 20.** Esquema de la modificación de la superficie electrónica para el desarrollo de los inmunosensores.



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

---





### 5.1.1. Magnetoimmunosensor para leptina

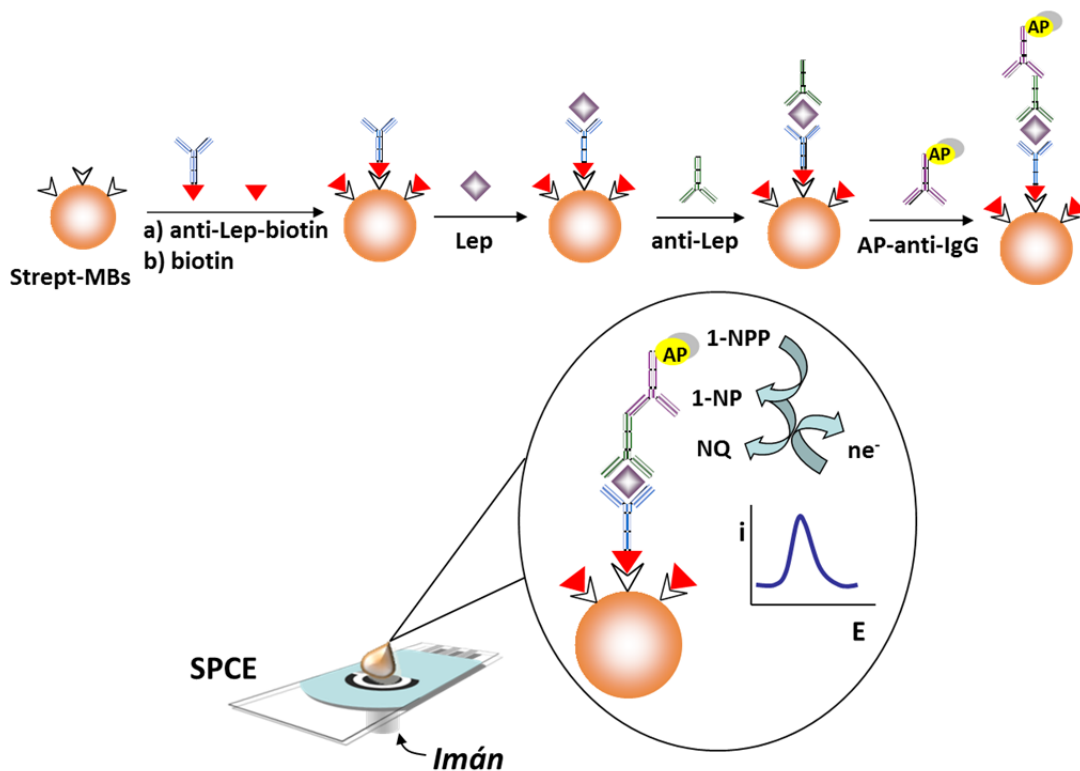
Según se ha descrito anteriormente, la leptina es una hormona peptídica producida y secretada por el tejido adiposo que regula de forma natural la ingesta de alimentos estimulando las neuronas anorexígenas y reduciendo la sensación de apetito. Los niveles en suero de personas con peso normal son de algunos ng/mL, aumentando en los pacientes obesos y disminuyendo en casos de anorexia nerviosa o de malnutrición. A pesar de haberse descubierto en una fecha relativamente reciente (1994), el interés de la comunidad científica y de la sociedad en general por esta hormona es muy alto, siendo particularmente importante la determinación de leptina en la leche materna.

Hay que señalar que, como se ha visto, los métodos disponibles son de tipo ELISA, con tiempos de ensayo largos (entre 2 y 5 h). Estos métodos abarcan intervalos de concentración de décimas (o centésimas) a centenares de ng/mL de analito en algunos casos, con límites de detección que pueden llegar a algunas decenas de pg/mL. En el momento de la escritura de esta Tesis Doctoral, únicamente se tenía noticia de tres configuraciones de inmunosensores para leptina en la bibliografía consultada.

Todo lo anterior justifica la construcción del inmunosensor electroquímico que se describe a continuación. Se eligieron micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, capaces de unir covalentemente biomoléculas biotiniladas, y detección voltamperométrica sobre los electrodos serigrafados de carbono. Ambos efectos contribuyeron a desarrollar una configuración de mejores características analíticas que las de los métodos existentes.

### 5.1.1.1. Configuración del magnetoinmunoensayador

Se ha desarrollado un magnetoinmunoensayador voltamperométrico desechable para la determinación de leptina en muestras de leche materna, leche de fórmula comercial para lactantes y suero. Se seleccionó un esquema de inmunoensayo de tipo sándwich, cuyo procedimiento se describe en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.1.1). Para ello, se emplea un anticuerpo de captura biotinilado y selectivo frente a esta proteína, que se inmoviliza sobre la superficie de partículas magnéticas comerciales funcionalizadas con estreptavidina; tras una etapa de bloqueo con una disolución de biotina, se incorpora el antígeno (Lep) y, a continuación, el anticuerpo secundario anti-Lep. La monitorización de la reacción de afinidad Ag-Ab se lleva a cabo empleando un anticuerpo anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 21. Para llevar a cabo la determinación, el magneto-inmunoconjugado AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs se inmoviliza sobre la superficie de un SPCE con ayuda de un pequeño imán, se añade 1-naftilfosfato (1-NPP) y se registra la respuesta de oxidación del 1-naftol, generado en la reacción enzimática.



**Figura 21.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del magnetoinmunoensayador AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs/SPCE.

### 5.1.1.2. Optimización de las variables experimentales

Con el fin de obtener una elevada sensibilidad y un amplio intervalo lineal en la determinación de leptina, se han optimizado las distintas variables experimentales implicadas en el desarrollo del magnetoinmosensores. En la Tabla 14 se recogen estas variables, los intervalos estudiados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

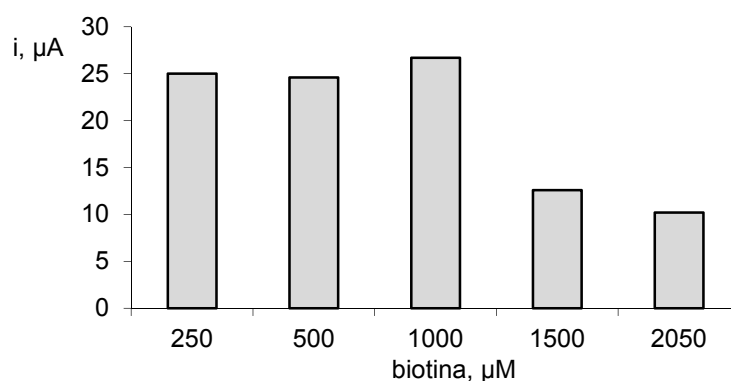
*Tabla 14.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs/SPCE para la determinación de leptina.*

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
anti-Lep-biotin, $\mu\text{g/mL}$	2 - 20	5
biotina, $\mu\text{M}$	250 - 2050	2050
anti-Lep, $\mu\text{g/mL}$	0.25 - 2	0.5
AP-anti-IgG, dilución	1:1000 - 1:20000	1:1000
1-naftilfosfato, mM	0.05 - 50	5
$t_{\text{hidrólisis}}$ , min	0 - 8	5

#### ***Etapas de bloqueo***

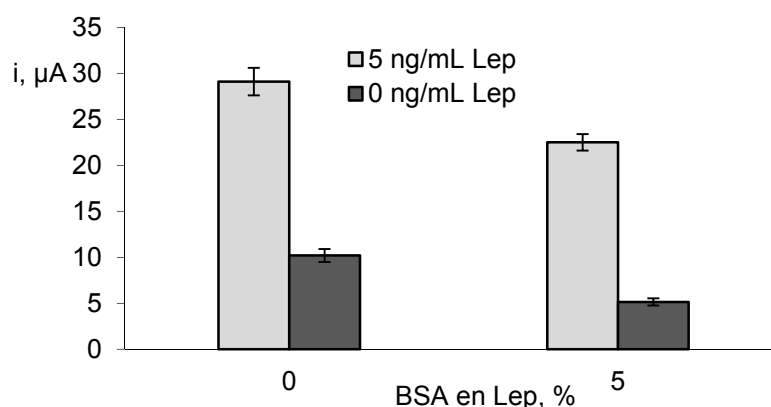
Para evitar en lo posible las uniones inespecíficas de los distintos inmunorreactivos sobre la superficie de las partículas magnéticas, se estudiaron distintos procedimientos de bloqueo en varias de las etapas de preparación del conjugado de partículas magnéticas.

En primer lugar, se estudió el bloqueo de las posiciones libres de la estreptavidina tras la inmovilización del anticuerpo biotinilado sobre las partículas magnéticas Strept-MBs. Para ello, el conjugado anti-Lep-biotin/Strept-MBs se incubó en una disolución de biotina de concentración variable, con el fin de minimizar la señal de corriente obtenida en ausencia de leptina. Los resultados mostrados en la Figura 22 ponen de manifiesto la necesidad de incluir esta etapa, siendo la concentración de biotina más adecuada de 2050  $\mu\text{M}$ . En estas condiciones la relación entre la señal específica (5 ng/mL de leptina) y la inespecífica (en ausencia de leptina) fue de 2.8.



**Figura 22.** Estudio de la influencia de la concentración de biotina utilizada como bloqueante: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG 1:5000 (45 min); 1-naftilfosfato 5 mM (5 min).

Con el fin de mejorar aún más esta relación, se evaluó la posibilidad de incluir BSA en las etapas de incubación de la leptina, del anticuerpo secundario y del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina [Centi, 2008]. A modo de ejemplo, en la Figura 23 se muestran las señales obtenidas para magnetoinmunosensores preparados en presencia y en ausencia de 5% de BSA en la etapa de incubación de la leptina, pudiendo comprobarse que la relación entre la señal correspondiente al mismo punto de calibrado y la señal del blanco aumenta de 2.8 a 4.4 cuando se prepara la disolución del antígeno en presencia de BSA.



**Figura 23.** Estudio de la influencia de BSA en la etapa de incubación de la leptina: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina 2050  $\mu\text{M}$  (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de Lep 5 ng/mL en 0% ó 5% de BSA (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG 1:5000 (45 min); 1-naftilfosfato 5 mM (5 min).

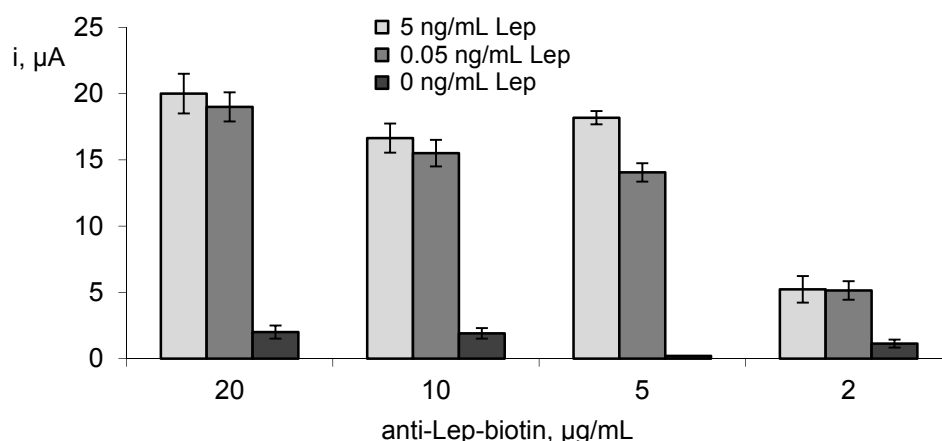
Los porcentajes de BSA óptimos en las etapas de incubación del anticuerpo secundario y del marcado con fosfatasa alcalina fueron de 5 y 2%, respectivamente.

La adición de 5% de BSA en la disolución del anticuerpo secundario, anti-Lep, supuso un aumento en la relación de señales para 5 y 0 ng/mL de analito de 4.4 a 9.5 y finalmente, la relación de señales fue de 13.3 al añadir un 2% de BSA en la etapa de incubación del anticuerpo de detección.

### ***Influencia de la concentración de anti-Lep-biotin***

La concentración del anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas juega un papel decisivo en el intervalo lineal y la sensibilidad de los inmunoensayos. Esta variable fue optimizada inmovilizando 50  $\mu\text{L}$  de disoluciones de anti-Lep en el intervalo de concentraciones de 2 a 20  $\mu\text{g/mL}$ , durante 1 hora. Los magneto-inmunosensores se prepararon en ausencia de leptina y en presencia de 0.05 ó 5 ng/mL de leptina ( $t_{\text{inc}} = 45$  min), 1  $\mu\text{g/mL}$  de anti-Lep ( $t_{\text{inc}} = 45$  min) y AP-anti-IgG 1:5000 ( $t_{\text{inc}} = 45$  min). Las medidas se realizaron empleando 1-naftilfosfato 5 mM como sustrato enzimático tras un tiempo de hidrólisis de 5 min.

Los resultados obtenidos (Figura 24) muestran la influencia de la variación de la concentración del anticuerpo anti-Lep-biotin. Puede observarse que una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo de captura es la que proporciona las mayores variaciones de señal entre 5 y 0.05 ng/mL, lo que se traduce en una mayor sensibilidad de la determinación. Además, esta concentración de anticuerpo es la que da lugar a la menor señal correspondiente a adsorciones inespecíficas (barras de color negro). Por tanto, se ha elegido este valor para posteriores estudios.

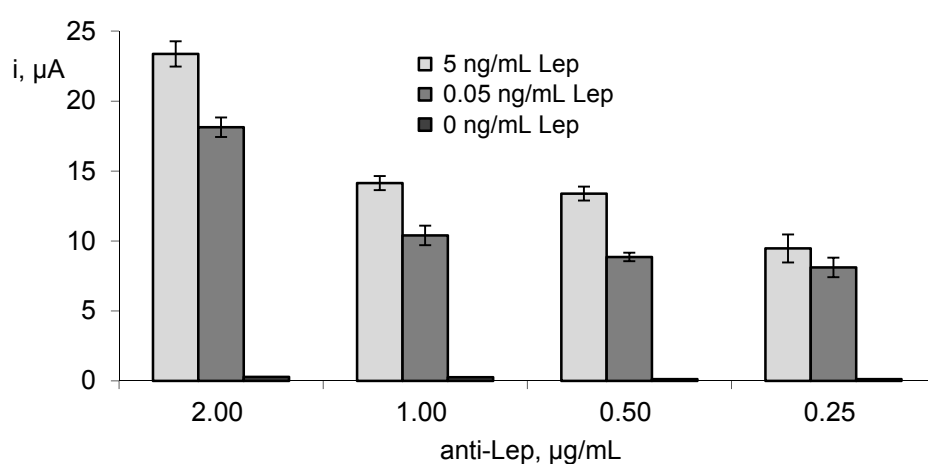


**Figura 24.** Influencia de la concentración de anti-Lep-biotin: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs, 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina 2050  $\mu\text{M}$  (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de Lep 0 - 5 ng/mL (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep 1  $\mu\text{g/mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG 1:5000 (45 min); 1-naftilfosfato 5 mM (5 min).

### ***Influencia de la cantidad de anti-Lep***

La concentración del anticuerpo secundario fue optimizada en el intervalo de 0.25 a 2  $\mu\text{g/mL}$ , empleando diferentes concentraciones de leptina. Como puede observarse en la Figura 25, las corrientes de pico obtenidas para una concentración de leptina de 5  $\text{ng/mL}$  empleando 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de anti-Lep fueron muy similares, indicando que se alcanza la saturación para una concentración de anticuerpo de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Por tanto, se seleccionó este valor para experimentos posteriores.

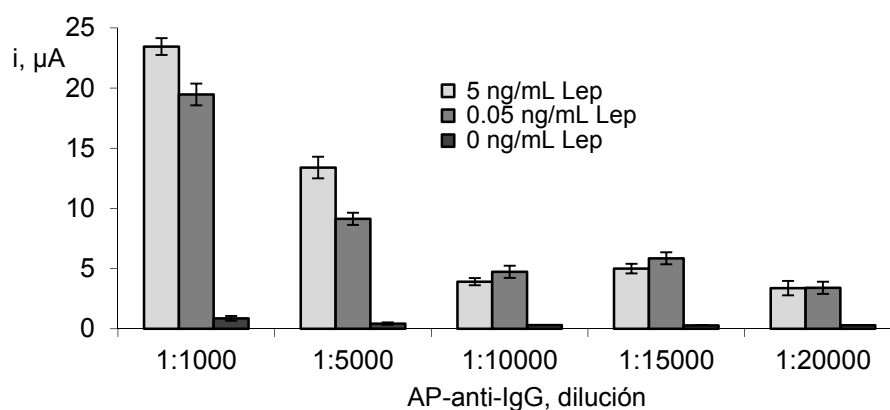
El aumento de señal observado al emplear una concentración de anticuerpo secundario 2  $\mu\text{g/mL}$ , que es muy superior a la necesaria para saturar 5  $\text{ng/mL}$  de antígeno, podría deberse a la formación de una doble capa de anticuerpo.



**Figura 25.** Influencia de la concentración de anti-Lep: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin 5  $\mu\text{g/mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina 2050  $\mu\text{M}$  (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de Lep 0 - 5  $\text{ng/mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG 1:5000 (45 min); 1-naftilfosfato 5  $\text{mM}$  (5 min).

### ***Influencia de la cantidad de AP-anti-IgG***

En la Figura 26, se han representado los resultados obtenidos en la optimización de la concentración del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, observándose que la mayor señal se obtiene empleando una dilución 1:1000, no apreciándose diferencias significativas en las señales registradas para diluciones menores. Por tanto, se seleccionó una dilución 1:1000 de AP-anti-IgG para experimentos posteriores.

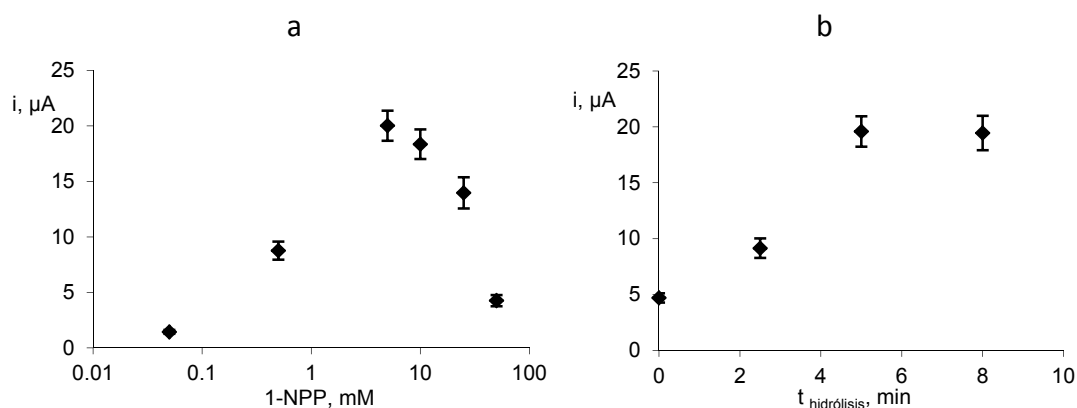


**Figura 26.** Influencia de la concentración de AP-anti-IgG: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina 2050  $\mu\text{M}$  (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de Lep 0 - 5  $\text{ng}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG (45 min); 1-naftilfosfato 5 mM (5 min).

### ***Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato y del tiempo de hidrólisis***

Una vez optimizadas las variables implicadas en el desarrollo del magnetoinmunsensor, se estudió la influencia de la concentración de 1-naftilfosfato sobre la respuesta de oxidación en voltamperometría diferencial de impulsos registrada en el intervalo de -0.15 a 0.60 V. La reacción enzimática de hidrólisis del 1-naftilfosfato se lleva a cabo a pH 9.0, valor que corresponde a la actividad óptima de la enzima fosfatasa alcalina [Ito, 2000]. Los resultados obtenidos en esas condiciones (Figura 27a) muestran el aumento de la corriente a medida que aumenta la concentración de sustrato en el intervalo comprendido entre 0.05 y 5 mM. A partir de esta concentración, la señal de corriente disminuye rápidamente. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de 1-naftilfosfato de 5 mM. Esta concentración es suficientemente alta como para asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de enzima sobre el electrodo. La disminución observada para concentraciones superiores de sustrato puede atribuirse al ensuciamiento de la superficie electródica, dada la elevada cantidad de 1-naftol generada en la reacción enzimática.

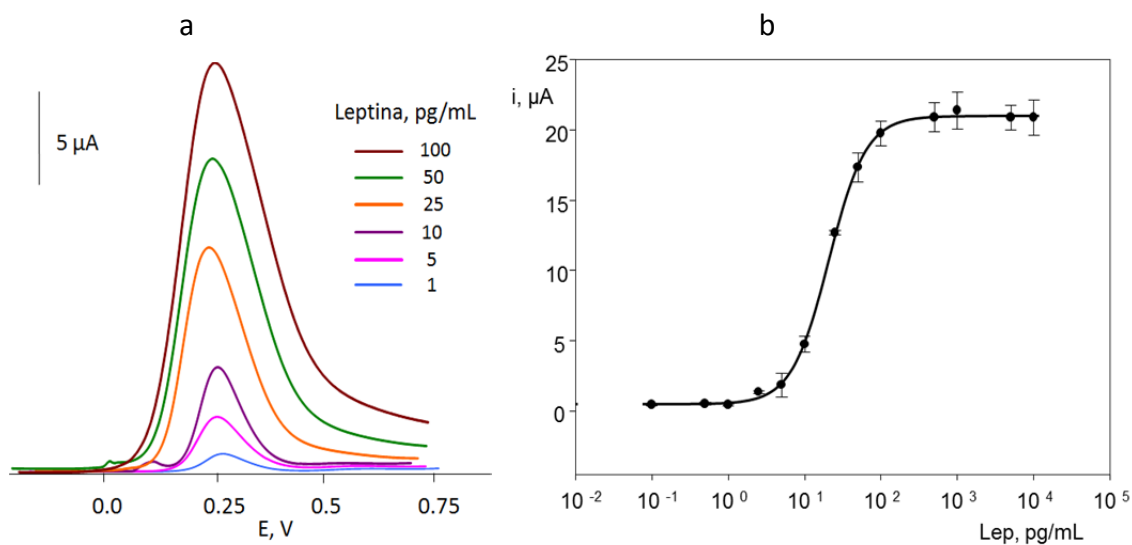
En estas condiciones, se estudió también el tiempo de duración de la reacción enzimática. Los resultados, que aparecen representados en la Figura 27b, muestran un aumento de la corriente de oxidación a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis hasta un valor de 5 minutos, estabilizándose para tiempos más largos. Consecuentemente, como solución de compromiso entre una buena sensibilidad y un corto tiempo de análisis, se escogió un tiempo de espera de 5 minutos.



**Figura 27.** Influencia de (a) la concentración de 1-naftilfosfato y (b) el tiempo de hidrólisis: 2  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep-biotin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de biotina 2050  $\mu\text{M}$  (30 min); 50  $\mu\text{L}$  de Lep 5  $\text{ng}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de anti-Lep 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (45 min); 50  $\mu\text{L}$  de AP-anti-IgG 1:5000 (45 min); a) 1-naftilfosfato (5 min). b) 1-naftilfosfato 5 mM.

### 5.1.1.3. Calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente y empleando como técnica de medida la voltamperometría diferencial de impulsos, se obtuvo una curva de calibrado para la leptina en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.0001 y 10  $\text{ng}/\text{mL}$ . A modo de ejemplo, en la Figura 28a se recogen algunos de los voltamperogramas registrados. Asimismo, en la Figura 28b se muestra la curva de calibrado, que presenta el hábito típico del formato sándwich, es decir, al aumentar la concentración de leptina se obtiene un incremento de la señal de oxidación de 1-naftol.



**Figura 28.** a) Voltamperogramas obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de leptina comprendidas entre 1 y 100  $\text{pg}/\text{mL}$ . b) Calibrado de leptina obtenido con el magnetoinmunsensor AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs/SPCE.

En la Tabla 15 aparecen las características analíticas del método desarrollado para la determinación de leptina con el magnetoinmunsensor. El intervalo de linealidad del calibrado se extiende entre 5.0 y 100 pg/mL ( $r = 0.991$ ). El límite de detección, 0.5 pg/mL, se calculó aplicando el criterio  $3s_b/m$ , donde  $m$  es la pendiente de la región lineal del calibrado, y  $s_b$  es una estimación de la desviación estándar del blanco, obtenida por medida repetida ( $n=10$ ) de las señales amperométricas correspondientes a la concentración más baja medible del calibrado, 5 pg/mL. Es de destacar que el límite de detección obtenido es mucho menor que el que presentan los métodos de inmunoensayo tipo ELISA disponibles comercialmente en forma de “kits”. También debe resaltarse que dicho límite es más de 27 veces inferior que el alcanzado con el único inmunsensor voltamperométrico para leptina encontrado en la bibliografía hasta ahora [Nishimura, 2011], y veinte mil veces menor que el obtenido con un inmunsensor impedimétrico libre de marcadores [Chen, 2010].

*Tabla 15.- Características analíticas del inmunsensor AP-anti-IgG/anti-Lep/Lep/anti-Lep-biotin/Strept-MBs/SPCE para la determinación de leptina.*

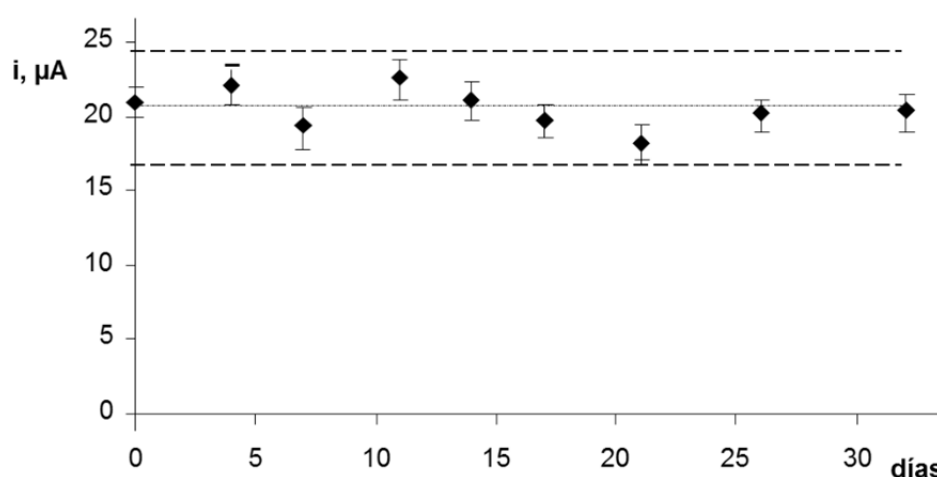
Ecuación	$y = a * \text{Log} [\text{Lep}] + b$
Intervalo lineal, pg/mL	5 – 100 $r = 0.991$
Pendiente, $\mu\text{A}$	$14.7 \pm 1.2$
Ordenada, $\mu\text{A}$	$-8.8 \pm 1.7$
LD, pg/mL	0.5
s, punto en presencia de 5 pg/mL de leptina, $\mu\text{A}$ ( $n=10$ )	0.24

### **Reproducibilidad y tiempo de vida**

Los estudios de reproducibilidad se realizaron por medida de las respuestas voltamperométricas de diferentes concentraciones de leptina empleando distintos magnetoinmunsensores preparados el mismo día. En estas condiciones se obtuvieron desviaciones estándar relativas comprendidas entre 6.0 y 7.4%, lo que pone de manifiesto que el procedimiento de fabricación del magnetoinmunsensor es fiable y presenta una buena reproducibilidad.

Por otro lado, también se evaluó la estabilidad del inmunoconjugado anti-Lep-biotin/Strept-MBs. Para ello se prepararon el mismo día tubos eppendorf que

contenían dicho conjugado y se almacenaron a 8°C en 50 µL de Tris-binding con 0.01% de Tween 20. Después, de forma sucesiva, cada día se prepararon inmunosensores con dicho conjugado y se realizaron tres medidas de la respuesta voltamperométrica para 100 pg/mL de leptina. En la Figura 29 se ha representado un gráfico de control en el que se han señalado los márgenes de  $\pm 3s$ , donde  $s$  es el valor de la desviación estándar correspondiente a la medida de la respuesta del magnetoinmuno sensor el primer día de trabajo ( $n = 10$ ). Como puede observarse, la media de las tres medidas realizadas cada día se encuentra dentro de dichos límites durante al menos 32 días, que fue el periodo máximo de tiempo estudiado, lo que pone de manifiesto la excelente estabilidad de los conjugados anti-Lep-biotin/Strept-MBs cuando se mantienen a 8°C. Esta característica tiene una gran importancia desde el punto de vista de la utilidad práctica del inmunosensor, ya que demuestra que es posible preparar varios conjugados, almacenarlos en las condiciones indicadas y, posteriormente, en el momento que se precise, construir el inmunosensor de leptina para su uso inmediato.



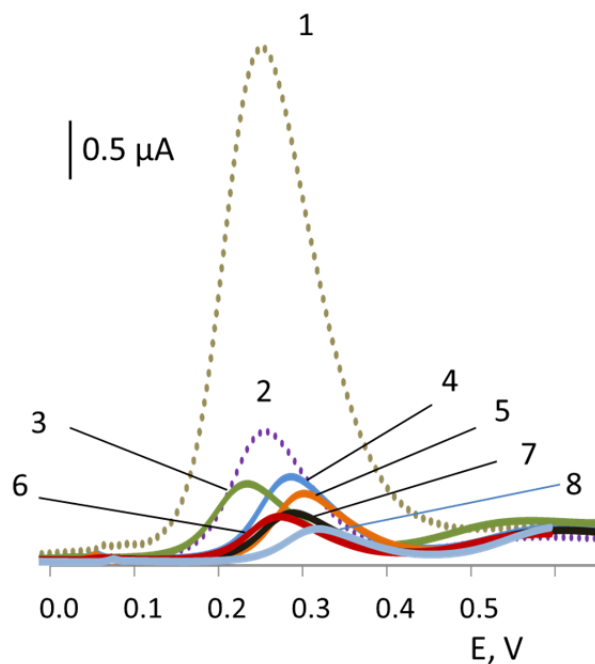
**Figura 29.** Estabilidad de anti-Lep-biotin/Strept-MBs en Tris-binding 0.01% de tween 20. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas para 100 pg/mL de leptina.

#### 5.1.1.4. Estudios de reactividad cruzada

La selectividad del inmunosensor depende fundamentalmente de la especificidad del anticuerpo de captura empleado y, para su evaluación, es preciso conocer el nivel de respuesta del mismo frente a otras especies, es decir, su reactividad cruzada, en comparación con la respuesta no específica frente a un blanco.

La leptina se determina en fluidos biológicos o en leche, lo que implica la coexistencia con otras hormonas y otros tipos de compuestos potencialmente interferentes. Por ello, para realizar el estudio de selectividad se evaluó la respuesta del magnetoinmunsensor frente a diferentes compuestos como ACTH, hGH, progesterona, prolactina, cortisol y estradiol.

En la Figura 30 se comparan los voltamperogramas registrados en presencia de 10 pg/mL de leptina (curva 1) y en ausencia de leptina (curva 2) con los de las especies anteriores a las concentraciones correspondientes a los niveles fisiológicos normales de cada una de ellas. Como puede observarse, todas las especies estudiadas presentaron una señal similar a la que se obtiene en ausencia de leptina, por lo que dichas señales pueden atribuirse a adsorciones inespecíficas. Esta elevada selectividad es una característica importante del magnetoinmunsensor desarrollado, y es debida a la gran especificidad de los anticuerpos para reaccionar con la leptina y no, o en un grado mucho menor, con otras especies.



**Figura 30.** Estudio de reactividad cruzada. Voltamperogramas obtenidos en presencia de: 10 pg/mL Lep (1), 0 pg/mL Lep (2); 250 ng/mL cortisol (3); 60 pg/mL ACTH (4); 1.5 ng/mL estradiol (5); 200 ng/mL progesterona (6); 50 ng/mL hGH (7) y 200 ng/mL prolactina (8).

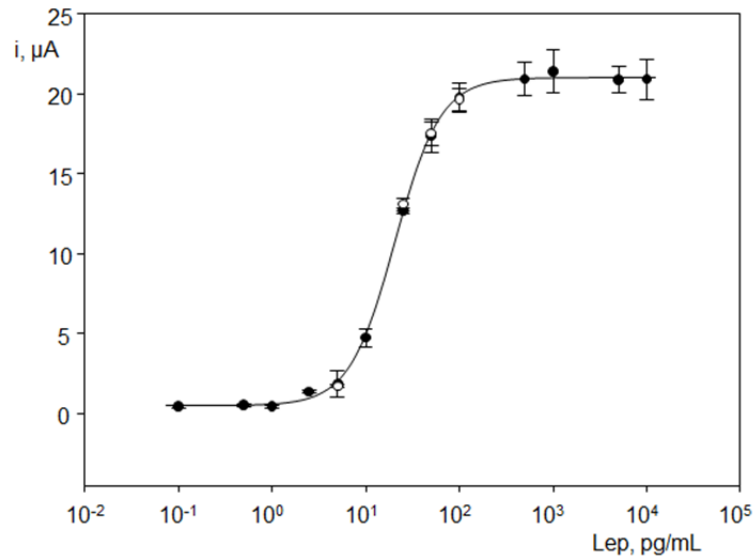
#### **5.1.1.5. Aplicación a la determinación de leptina en suero humano, en leche en polvo para lactantes y en leche materna**

La utilidad del inmunosensor para el análisis de muestras reales se evaluó en primer lugar por aplicación a una muestra de suero enriquecida con diferentes concentraciones de leptina a nivel fisiológico. A continuación, como aproximación a la leche materna, se analizó un preparado de leche en polvo para lactantes enriquecido con leptina y, finalmente, se determinó la concentración de leptina en una muestra de leche materna de una voluntaria con un IMC de 27.3 y dos meses de lactancia. A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

##### ***Suero humano enriquecido***

Primero se comprobó que el suero sin enriquecer no proporcionaba ninguna respuesta voltamperométrica, demostrándose así que éste no contenía leptina ni compuestos endógenos interferentes o que, al menos, sus concentraciones quedaban por debajo del límite de detección del método. Después se investigó la existencia de efecto matriz de la muestra de suero. Para ello se prepararon diferentes diluciones de suero y a continuación se enriquecieron con 100 pg/mL de leptina, observándose que las señales obtenidas para una dilución 1:100 o superior del suero son análogas a la obtenida para esa misma concentración en medio regulador Tris-binding.

Dado que las concentraciones de leptina habituales en suero son del orden de ng/mL, tras la contaminación de la muestra de suero con 5, 25, 50 y 100 ng/mL de leptina, se realizó una dilución 1:1000 en regulador Tris-binding con el fin de que las concentraciones de las disoluciones de medida (5, 25, 50 y 100 pg/mL) estuvieran incluidas en el tramo lineal del calibrado de patrones, tal como se describe en el procedimiento 4.5.4.1 de la Parte Experimental. Como se ha mencionado, la dilución de la muestra en esta proporción garantiza la ausencia de efecto matriz. En la Figura 31 se ha representado dicho calibrado superpuesto al intervalo recto obtenido para los patrones de leptina, encontrándose un ajuste perfecto entre ambos.



**Figura 31.** Superposición de las señales obtenidas para la muestra de suero al calibrado de patrones

Bajo estas condiciones, se obtuvo un calibrado con una pendiente del tramo lineal de  $13.5 \pm 0.4 \mu\text{A}$  por década de concentración. La comparación estadística de este valor con la pendiente para la recta que define el calibrado de patrones,  $14.7 \pm 1.2 \mu\text{A}$  por década de concentración, proporcionó un valor de  $t$  de Student experimental ( $t_{\text{exp}}$ ) de 1.057. Dado que este valor es inferior al teórico para las condiciones del experimento (para  $\nu=6$ ,  $t_{\text{teór}}=2.447$ ), se demuestra que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de calibrado. Este resultado indica que la determinación de leptina en suero puede llevarse a cabo por interpolación directa de la corriente de pico obtenida para la muestra en el calibrado de patrones y posterior aplicación del factor de dilución de la muestra.

En la Tabla 16 se resumen los resultados obtenidos. Como puede apreciarse, las recuperaciones alcanzadas para las muestras ensayadas, a cuatro niveles distintos de concentración, fueron en todos los casos próximas al 100%, demostrando la utilidad analítica del inmunosensor para la determinación de leptina en muestras de suero.

*Tabla 16.- Determinación de leptina en suero humano enriquecido.*

Lep, ng/mL	Lep encontrada, ng/mL	Recuperación, %
5.0	$4.8 \pm 0.2$	$96 \pm 5$
25	$25.5 \pm 1.3$	$102 \pm 5$
50	$51 \pm 3$	$101 \pm 6$
100	$96 \pm 2$	$96 \pm 2$

**Leche en polvo para lactantes**

Con el fin de ensayar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado a la determinación de leptina en leche materna, primero se comprobó la obtención de buenos resultados para el análisis de un preparado de leche en polvo para lactantes (Blemil plus 1 forte) que no contiene leptina en su composición. Para ello, se enriqueció la muestra a dos niveles de concentración, 1 y 7 ng/mL, y se realizaron diluciones 1:100 y 3:1000, respectivamente, con regulador Tris-binding en presencia de un 5% de BSA para llevar a cabo su análisis como se describe en la Parte Experimental. Estas diluciones garantizaron la ausencia de efecto matriz y proporcionaron concentraciones de leptina en las disoluciones de medida incluidas dentro del intervalo lineal de la curva de calibrado de patrones. Los resultados obtenidos se muestran la Tabla 17. Las recuperaciones alcanzadas pusieron de manifiesto la aplicabilidad del magnetoinmunosensor a la determinación de leptina en fórmulas comerciales de leche infantil para lactantes.

*Tabla 17.- Determinación de Leptina en una muestra de fórmula de leche para lactantes.*

Lep, ng/mL	Lep encontrada, ng/mL	Recuperación, %
1.0	0.98 ± 0.08	98 ± 8
7.0	7.2 ± 0.3	102 ± 4

**Leche materna**

Según se describe en la Parte Experimental, antes de la determinación de leptina en leche materna, fue necesario aplicar un tratamiento de ultrasonidos para la liberación de la leptina presente en la grasa. Seguidamente se procedió al desnatado de la muestra por centrifugación a 2000 rpm durante 20 min a 4°C, para evitar posibles interferencias y, finalmente, se llevó a cabo el análisis con el magnetoinmunosensor. Dada la elevada complejidad de la muestra, primero se evaluó la existencia de efecto matriz comparando estadísticamente las pendientes del calibrado externo ( $14.7 \pm 1.2 \mu\text{A}$ ), y del calibrado obtenido mediante adiciones estándar sobre la muestra ( $15.2 \pm 0.3 \mu\text{A}$ ). Para ello, se aplicó el test de la t de Student, obteniendo un valor,  $t_{\text{exp}} = 0.405$ , inferior a la t de Student tabulada ( $t_{\text{tab}} = 2.571$ ,  $n = 5$ ) para un nivel de significación de 0.05, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las pendientes y, por

lo tanto, la ausencia de efecto matriz en este tipo de muestras. Por consiguiente, la determinación del contenido de leptina se realizó por interpolación en el calibrado externo.

Se analizaron dos muestras de leche materna proporcionadas por dos madres que se encontraban en el segundo mes de lactancia. Las concentraciones de leptina encontradas empleando el magnetoinmunoensayador (Tabla 18) se encuentran dentro de los niveles normales en este tipo de muestra, comprendidos entre 0.11 y 4.97 ng/mL [Ilcol, 2006].

Con el fin de demostrar la validez del método propuesto, los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por un kit ELISA comercial adecuado para la determinación de leptina en este tipo de muestras. Los resultados obtenidos empleando el kit comercial no presentan diferencias significativas con respecto a los obtenidos empleando el magnetoinmunoensayador ( $t_{\text{cal}} 2.548 < t_{\text{tab}} 2.776$ ), lo que demuestra la utilidad de la configuración desarrollada para la determinación de leptina en leche materna.

*Tabla 18.- Determinación de Leptina en las muestras de leche materna empleando el magnetoinmunoensayador desarrollado y un kit ELISA comercial.*

	Magnetoinmunoensayador, ng/mL	ELISA, ng/mL
Leche 1	2.6 ± 0.13	2.9 ± 0.5
Leche 2	0.98 ± 0.12	0.94 ± 0.15

#### 5.1.1.6. Conclusiones

Como conclusiones a esta parte cabe resaltar que se ha desarrollado un magnetoinmunoensayador para la determinación de leptina basado en un formato tipo sándwich sobre partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina y usando SPCEs como transductor de la señal.

El magnetoinmunoensayador presenta excelentes características analíticas en términos de sensibilidad, presentando un límite de detección menor que los alcanzados en los inmunoensayos tipo ELISA disponibles, y también los de las escasas configuraciones de inmunoensayadores existentes para este analito,

El diseño desarrollado en este trabajo posee también una alta selectividad, gracias a la elevada especificidad de los inmunorreactivos empleados en su preparación, así como reproducibilidad y buena estabilidad del inmunoconjugado.

Estas características, unido al uso de electrodos serigrafiados producidos en masa, hacen del inmunosensor desechable propuesto una interesante plataforma de análisis, que se presenta como una alternativa fiable, útil y asequible frente a los métodos descritos hasta el momento para la determinación de leptina en muestras de suero, fórmulas de leche infantil y leche materna.

### 5.1.2. Magnetoinmunoensayo para interleucina 6

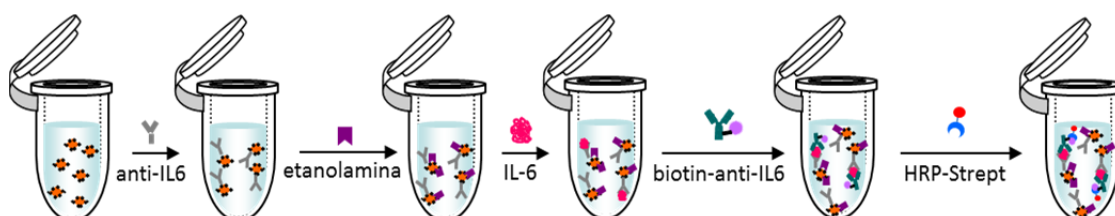
Como se ha indicado, la interleucina 6 (IL-6) es una de las citoquinas mejor estudiadas en relación con la obesidad, desempeñando un papel principal en la respuesta inflamatoria. Se ha señalado la similitud estructural y funcional que muestra con la leptina, aunque las concentraciones de IL-6 son mucho menores. La determinación de los niveles de IL-6 en saliva puede emplearse como un biomarcador del cáncer de lengua. Por otra parte, la determinación del nivel de IL-6 en orina es útil para la detección de pielonefritis en niños, encontrándose en estos casos niveles superiores a 15 pg/mL. Por otra parte, los niveles séricos de IL-6 en individuos sanos se encuentran en el entorno de los pg/mL, estos niveles aumentan en presencia de procesos inflamatorios, en casos de obesidad o diabetes tipo 2, alcanzando el orden de ng/mL. De lo anteriormente expuesto puede deducirse que la determinación de IL-6 en muestras clínicas requiere el uso de métodos muy sensibles.

Los inmunoensayos ELISA disponibles permiten la determinación de IL-6 en intervalos de concentración comprendidos mayoritariamente entre las unidades y varias centenas de pg/mL, con tiempos de ensayo largos, varios de ellos por encima de las cuatro horas. Para esta proteína se han desarrollado, además, varios inmunoensayos electroquímicos aplicados a muestras de suero, con límites de detección que llegan a alcanzar las décimas de pg/mL.

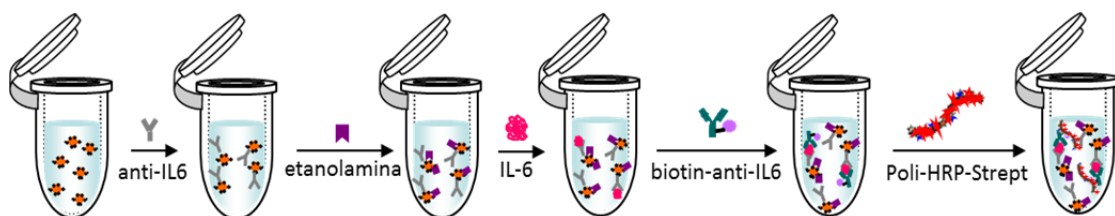
El objetivo del siguiente trabajo fue la preparación de un magnetoinmunoensayo tipo sándwich para interleucina 6 en orina y saliva. Con el fin de incrementar la sensibilidad de la detección, se emplea una novedosa estrategia de amplificación de la señal que implica la sustitución del marcaje enzimático habitual, estreptavidina marcada con peroxidasa, para la monitorización de la presencia del anticuerpo biotinilado, por un polímero que tiene anclado un elevado número de moléculas de estreptavidina y de la enzima peroxidasa. Como se verá a continuación, cuando se emplea el polímero de estreptavidina-HRP la variación más significativa en la corriente medida se produjo para las concentraciones de antígeno más bajas, lo que pone de manifiesto los beneficios de su utilización para la obtención de una mayor sensibilidad.

### 5.1.2.1. Configuración del magnetoinmuno sensor

De acuerdo con el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.1.2), en la Figura 32 se muestra un esquema de la construcción del magnetoinmuno sensor, representándose las etapas de preparación de los inmunoconjugados en tubos eppendorf. Como puede observarse, primero se inmovilizó el anticuerpo de captura (anti-IL-6) sobre las micropartículas magnéticas carboxiladas (HOOC-MBs) previamente activadas con el sistema EDC/NHSS y, tras una etapa de bloqueo con etanolamina, se procedió a incubar el conjugado en la disolución del antígeno, seguida de una incubación en la disolución del anticuerpo de detección (biotin-anti-IL-6) y en la del conjugado HRP-Strept (Figura 32a) o bien del polímero poli-HRP-Strept (Figura 32b).



**Figura 32a.** Esquema de la preparación del conjugado HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs



**Figura 32b.** Esquema de la preparación del conjugado Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs

El empleo del sustrato enzimático  $H_2O_2$  permite la obtención de la señal electroanalítica en presencia del mediador redox HQ mediante la secuencia de reacciones mostrada en la Figura 32c. Las medidas se llevan a cabo mediante amperometría a un potencial de  $-200$  mV [Eguílaz, 2010].

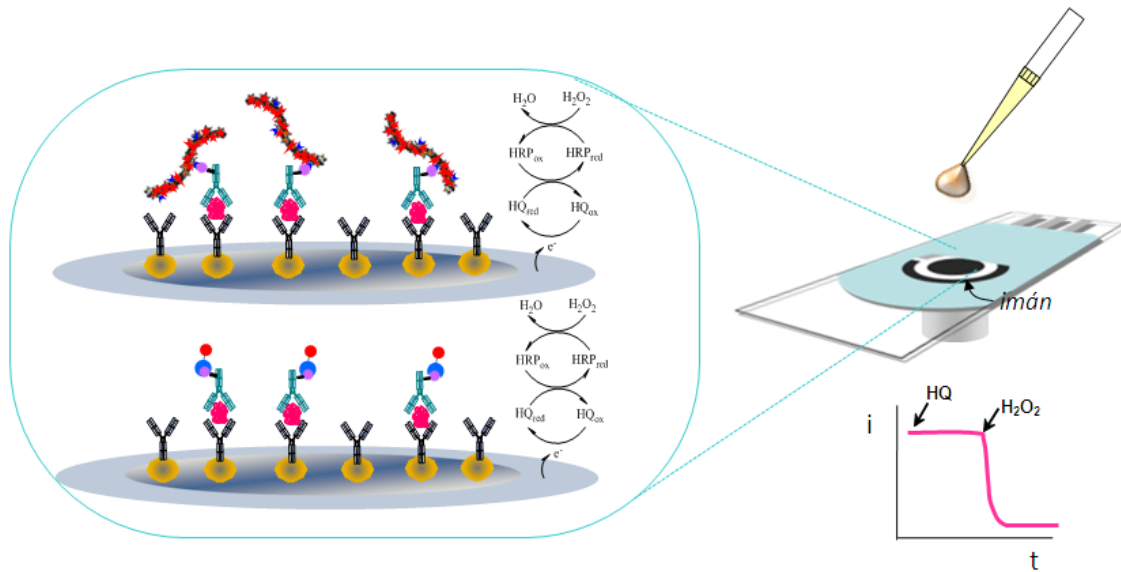


Figura 32c. Esquema del funcionamiento del inmunosensor

### 5.1.2.2. Optimización de las variables experimentales del inmunosensor preparado con HRP-Strept

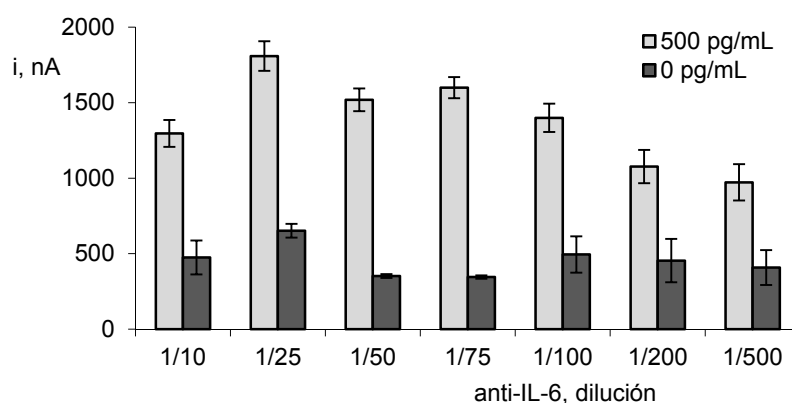
Se estudió la influencia de las variables que afectan a la preparación del inmunosensor con el fin de optimizar las condiciones de trabajo para la determinación de IL-6. Los resultados obtenidos, que se discuten a continuación, se han resumido en la Tabla 19, en la que se muestran los intervalos estudiados y el valor seleccionado para cada una de ellas.

Tabla 19: Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs.

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
anti-IL-6, dilución	1/10 - 1/500	1/75
t <sub>inc</sub> anti-IL-6, min	30 - 60	30
t <sub>inc</sub> IL-6, min	30 - 60	30
biotin-anti-IL-6, dilución	1/50 - 1/1000	1/250
t <sub>inc</sub> biotin-anti-IL-6, min	30 - 60	30
HRP-Strept, dilución	1/250 - 1/4000	1/3000

### ***Influencia de la concentración de anti-IL-6***

Para seleccionar la concentración más adecuada del anticuerpo de captura, se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones de anti-IL-6 en el intervalo de diluciones de 1/10 a 1/500 en medio MES de pH 5.0 y se incubaron las partículas magnéticas activadas en un volumen de 25  $\mu$ L durante 1 hora. A este valor de pH, las proteínas son pre-adsorbidas electrostáticamente sobre los grupos carboxílicos disociados, mejorando así la unión covalente [Puertas, 2013]. Seguidamente, se continúa con las siguientes etapas del inmunoensayo, tal y como se describe en el apartado 4.5.1.3 de la Parte Experimental, es decir, el bloqueo con etanolamina, la incubación en la disolución del antígeno y del anticuerpo biotinilado y, finalmente en una disolución de HRP-Strept. Con fines comparativos, se realizaron experimentos análogos en ausencia de interleucina 6. Como se observa en la Figura 33, para diluciones superiores a 1/100 se observa una disminución progresiva de la señal específica, debido a la menor cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre la superficie de las partículas magnéticas. La mejor relación entre las señales en presencia y en ausencia de IL-6 se obtiene para diluciones de anti-IL-6 de 1/50 y 1/75, habiéndose escogido esta última proporción ya que conlleva un menor consumo de reactivo.

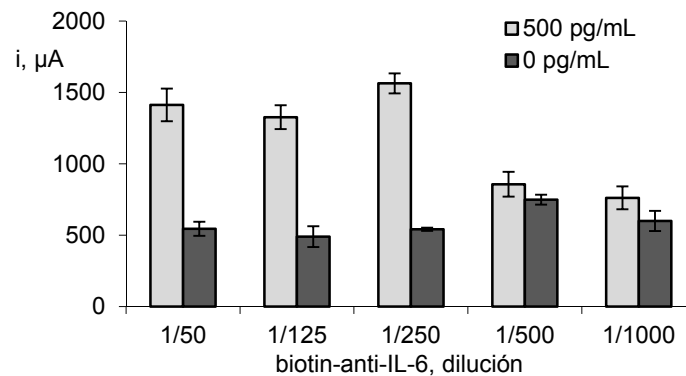


**Figura 33.** Influencia de la concentración de anti-IL-6: 3  $\mu$ L de MBs; 25  $\mu$ L de anti-IL-6, 60 min; 25  $\mu$ L de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu$ L de IL-6, 0 ó 500 pg/mL (60 min); 25  $\mu$ L de biotin-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu$ L de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia de la concentración de biotin-anti-IL-6***

La elección de la concentración del anticuerpo biotinilado de detección, biotin-anti-IL-6, se realiza preparando inmunosensores empleando el anticuerpo de captura en la proporción seleccionada anteriormente y disoluciones de anti-IL-6-biotin en el intervalo de diluciones de 1/50 a 1/1000, en ausencia y en presencia de

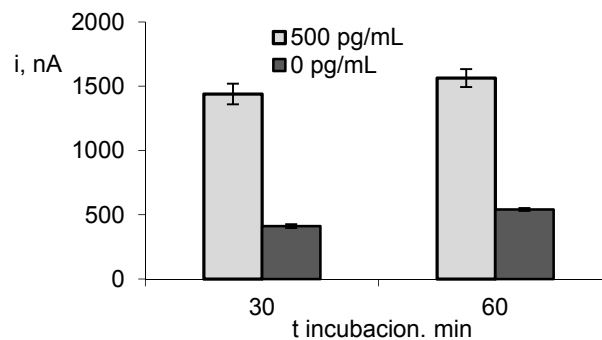
500 pg/mL de interleucina 6. Como puede observarse en la Figura 34, la relación de señales obtenidas en ambas situaciones (con y sin IL-6) es similar para diluciones del anticuerpo comprendidas entre 1/50 y 1/250, siendo para esta última proporción ligeramente superior, por lo que fue la elegida para estudios posteriores.



**Figura 34.** Influencia de la concentración de biotin-anti-IL-6: 3  $\mu\text{L}$  de MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-IL-6, 1/75 (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de IL-6, 0 ó 500 pg/mL (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-IL-6 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept 1/1000 (30 min)

#### ***Influencia del tiempo de incubación de anti-IL-6 y de IL-6***

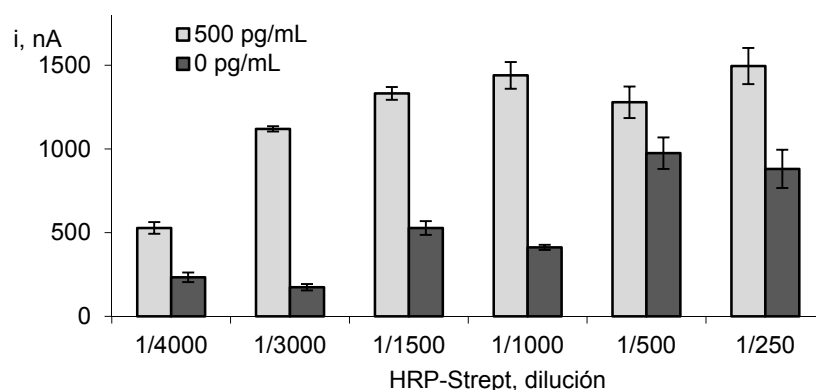
Con el fin de reducir el tiempo de preparación del magnetoinmunsensor se estudió la posibilidad de disminuir los tiempos de las etapas de incubación del anticuerpo de captura y del analito de 60 a 30 min. En la Figura 35 se muestran las intensidades de corrientes obtenidas para el inmunsensor en ausencia y en presencia de 500 pg/mL de IL-6 para tiempos de incubación de 30 y 60 min. Como puede observarse, los resultados obtenidos demostraron que es posible reducir a la mitad el tiempo de incubación de ambas etapas sin que la sensibilidad del inmunsensor empeore significativamente.



**Figura 35.** Influencia del tiempo de incubación de anti-IL-6 y de IL-6: 3  $\mu\text{L}$  de MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-IL-6 1/75; 25  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de IL-6, 0 ó 500 pg/mL; 25  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia de la concentración de HRP-Strept***

Finalmente, se estudió la influencia de la cantidad de HRP-Strept empleada en la determinación de IL-6. Los resultados de la Figura 36, muestran una mejor relación de señales obtenidas en presencia y ausencia de analito para una dilución 1/3000 del reactivo marcado.



**Figura 36.** Influencia de la cantidad de HRP-Strept: 3  $\mu\text{L}$  de MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-IL-6, 1/75 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de IL-6, 0 ó 500  $\text{pg/mL}$  (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept (30 min).

#### **5.1.2.3. Optimización de las variables experimentales del inmunosensor preparado con Poli-HRP-Strept**

Como se ha dicho, con el fin de mejorar la sensibilidad de la determinación de IL-6, se diseñó una estrategia de amplificación de la respuesta electroquímica usando un conjugado polimérico de peroxidasa-estreptavidina (Poli-HRP-Strept). Así, para realizar estos estudios, los diferentes magnetoinmunosensores se prepararon sustituyendo el biorreactivo HRP-Strept por dicho polímero. Además, la concentración de IL-6 empleada fue menor, 125  $\text{pg/mL}$  en lugar de 500  $\text{pg/mL}$ , con el fin de garantizar que dicha concentración no se encontrara en la zona de saturación del calibrado.

De forma similar a la del Apartado anterior, en la Tabla 20 se han resumido las variables experimentales evaluadas, los intervalos estudiados y los valores seleccionados para cada una de ellas.

Tabla 20: Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs.

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
BSA en disolución de Poli-HRP-Strept, %	0 - 1	0
anti-IL-6, dilución	1/37.5 - 1/150	1/75
biotin-anti-IL-6, dilución	1/50 - 1/1000	1/250
Poli-HRP-Strept, dilución	1/500 - 1/5000	1/500
$t_{inc}$ anti-IL-6.biotin y Poli-HRP-Strept, min	30 15 + 15 15 + 30 30 + lavado + 15 30 + lavado + 30	30 + lavado + 30

### ***Influencia de la presencia de BSA en la disolución de Poli-HRP-Strept***

En primer lugar se evaluó la posibilidad de adicionar BSA al 1% a la disolución de Poli-HRP-Strept empleada en la realización del inmunoensayo, tal como recomienda la casa comercial suministradora. Sin embargo, como se observa en la Figura 37, la presencia de BSA no supone una mejora en la relación de señales obtenidas en presencia y en ausencia de IL-6, por lo que se decidió no seguir esta sugerencia.

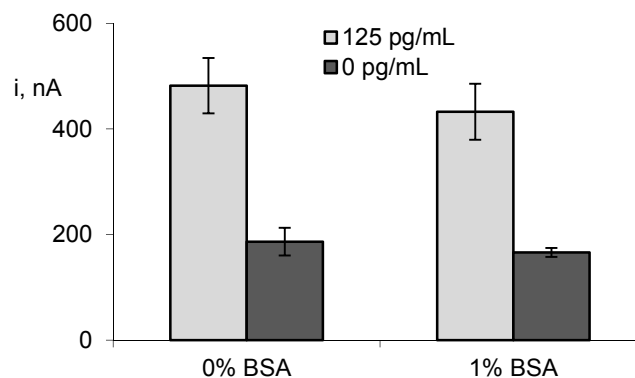
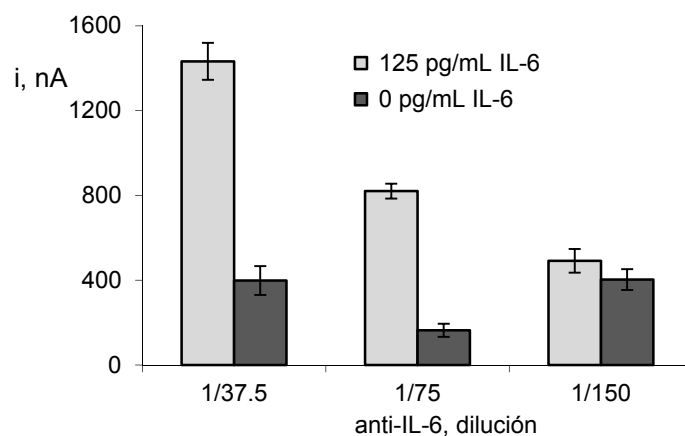


Figura 37. Influencia de la adición de BSA a la disolución de Strept-Poli-HR-: 3  $\mu$ L de MBs; 25  $\mu$ L de anti-IL-6 1/75 (30 min); 25  $\mu$ L de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu$ L de IL-6, 0 ó 125 pg/mL (30 min); 25  $\mu$ L de biotin-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu$ L de Poli-HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia de la concentración de anti-IL-6***

Aunque es de esperar que la concentración óptima del anticuerpo de captura no cambie por el hecho de utilizar el polímero de estreptavidina-HRP, se realizaron ensayos variando la concentración de anti-IL-6 en el intervalo de concentraciones que

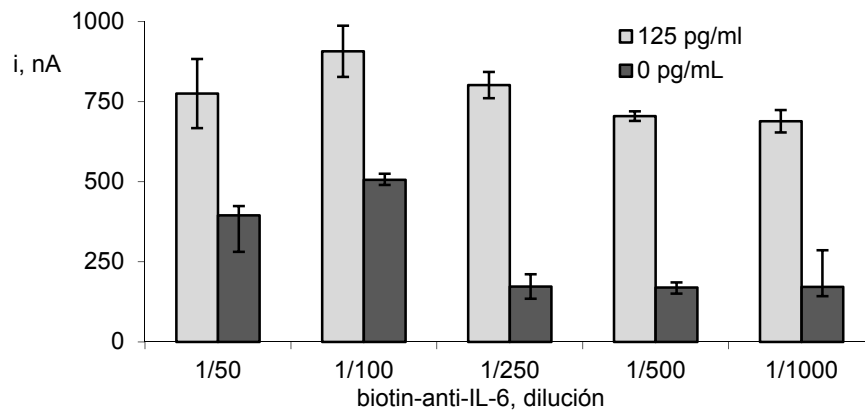
había proporcionado una mejor respuesta para el magnetoinmunsensor anterior utilizando HRP-Strept. Para ello se prepararon diferentes magnetoinmunsensores empleando diluciones de anti-IL-6 entre 1/37.5 y 1/150. Efectivamente, como se muestra en la Figura 38, la mayor relación de señales en presencia y en ausencia de IL-6 se obtuvo para una dilución 1/75 de anti-IL-6, coincidente con la seleccionada en el apartado 5.1.2.2.



**Figura 38.** Influencia de la cantidad de anti-IL-6: 3  $\mu\text{L}$  de MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-IL-6 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de IL-6, 0 ó 125 pg/mL (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de Poli-HRP-Strept 1/1000 (30 min).

#### ***Influencia de la concentración de biotin-anti-IL-6***

Para elegir la concentración de biotin-anti-IL-6 más adecuada se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetoinmunsensores haciendo diluciones de la disolución comercial del anticuerpo biotinilado comprendidas entre 1/50 y 1/1000. Como se observa en la Figura 39, la relación entre las señales amperométricas obtenidas en presencia y en ausencia de analito fue máxima para una dilución 1/250. Asimismo, puede observarse que para concentraciones más elevadas del anticuerpo secundario se observa un incremento significativo de la respuesta en ausencia de analito, lo que se debe probablemente al aumento de las señales debidas a las adsorciones inespecíficas como consecuencia de la amplificación de la señal en presencia del polímero de estreptavidina-HRP.



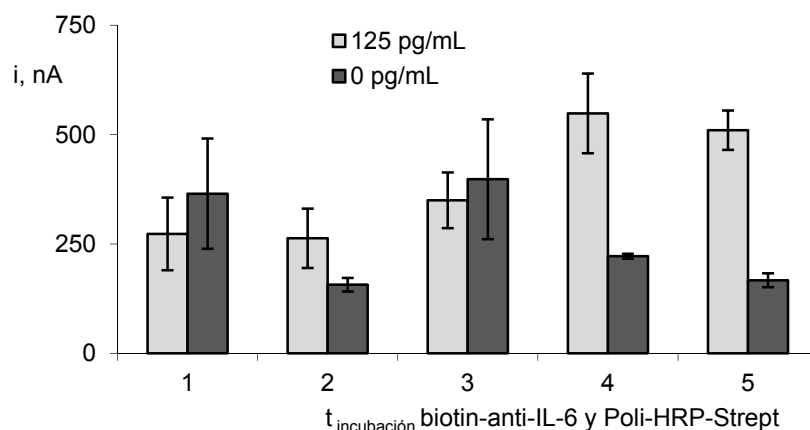
**Figura 39.** Influencia de la cantidad de biotin-anti-IL-6: 3  $\mu$ L de MBs; 25  $\mu$ L de anti-IL-6 (30 min); 25  $\mu$ L de etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu$ L de IL-6, 0 ó 125 pg/mL (30 min); 25  $\mu$ L de biotin-anti-IL-6 (30 min); 25  $\mu$ L de Poli-HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia del tiempo de incubación del anticuerpo biotinilado y del polímero de estreptavidina-HRP***

Para seleccionar los tiempos de incubación del conjugado de partículas magnéticas, IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs, en la disolución del anticuerpo biotinilado y del polímero de estreptavidina-HRP, se evaluaron las respuestas obtenidas en presencia y ausencia de IL-6, llevando a cabo una única etapa de incubación en una mezcla de ambos biorreactivos, o bien realizando dos etapas de incubación en cada una de ellos por separado, incluyendo o no una etapa de lavado entre ellas.

En el primer caso, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas obtenidas en ausencia y en presencia de IL-6 (Figura 40: barras 1). Este hecho puede deberse a la unión de varias moléculas de polímero al anticuerpo biotinilado, ya que el marcaje con biotina de los anticuerpos se produce por más de una posición de la biomolécula, dando lugar a la formación de un entramado que dificulta por impedimento estérico la interacción de afinidad del anticuerpo con el antígeno de las partículas magnéticas.

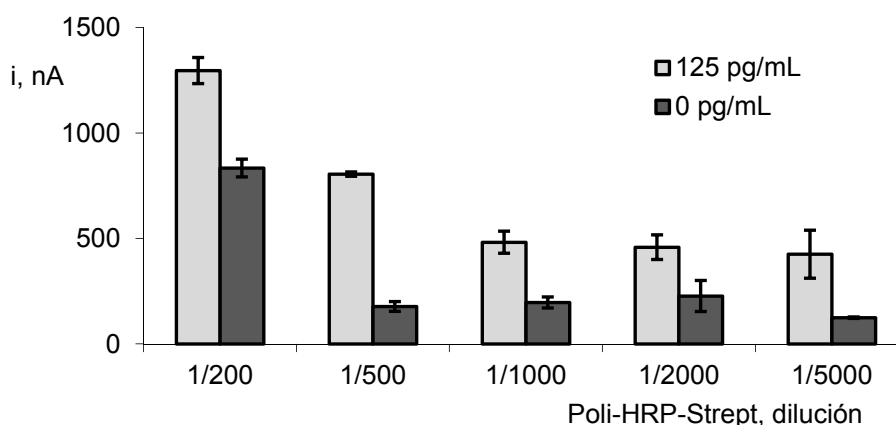
Seguidamente, se realizaron pruebas realizando incubaciones por separado del anticuerpo biotinilado y del polímero Poli-HRP-Strept, sin lavado intermedio (Figura 40: barras 2 y 3) o incluyendo una etapa de lavado (Figura 40: barras 4 y 5). Los mejores resultados se obtuvieron realizando dos etapas de incubación de 30 min cada una y una etapa de lavado entre ellas (Figura 40: barras 5).



**Figura 40.** Influencia del tiempo de incubación de biotín-anti-IL-6 y Poli-HRP-Strept: 3  $\mu$ L MBs; 25  $\mu$ L anti-IL-6 1/75 (30 min); 25  $\mu$ L etanolamina 1 M, (60 min); 25  $\mu$ L IL-6, 0 ó 125 pg/mL, (30 min); 25  $\mu$ L biotín-anti-IL-6 1/250; 25  $\mu$ L Poli-HRP-Strept 1/1000. 1) 30 min; 2) 15 min + 15 min; 3) 15 min + 30 min; 4) 30 min + lavado + 15 min; 5) 30 min + lavado + 30 min

### ***Influencia de la concentración de Poli-HRP-Strept***

Finalmente se estudió la concentración de Poli-HRP-Strept. En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos para diluciones del polímero en el intervalo de 1/200 a 1/5000. Como puede observarse, la dilución 1/500 es la que proporciona la mejor relación de señales, ya que se produce un aumento en la señal específica sin apenas variar la señal atribuida a adsorciones inespecíficas. Una dilución menor, 1/200, dio lugar a un aumento significativo de la señal obtenida en ausencia de IL-6.

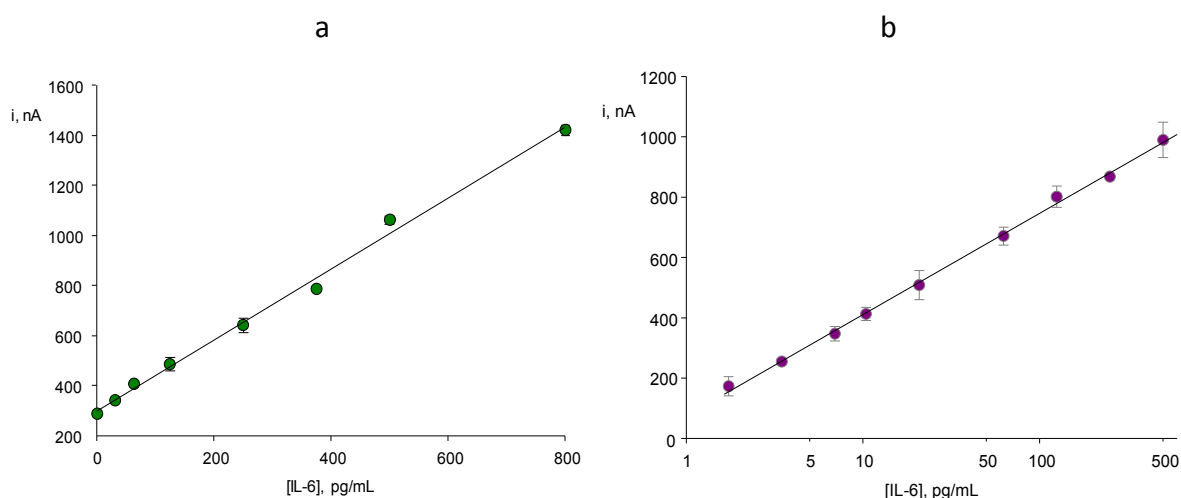


**Figura 41.** Influencia de la cantidad de Poli-HRP-Strept: 3  $\mu$ L MBs; 25  $\mu$ L anti-IL-6 1/75 (30 min); 25  $\mu$ L etanolamina 1 M (60 min); 25  $\mu$ L IL-6, 0 ó 125 pg/mL (30 min); 25  $\mu$ L biotín-anti-IL-6 1/250 (30 min); 25  $\mu$ L Poli-HRP-Strept (30 min)

#### 5.1.2.4. Curvas de calibrado y características analíticas

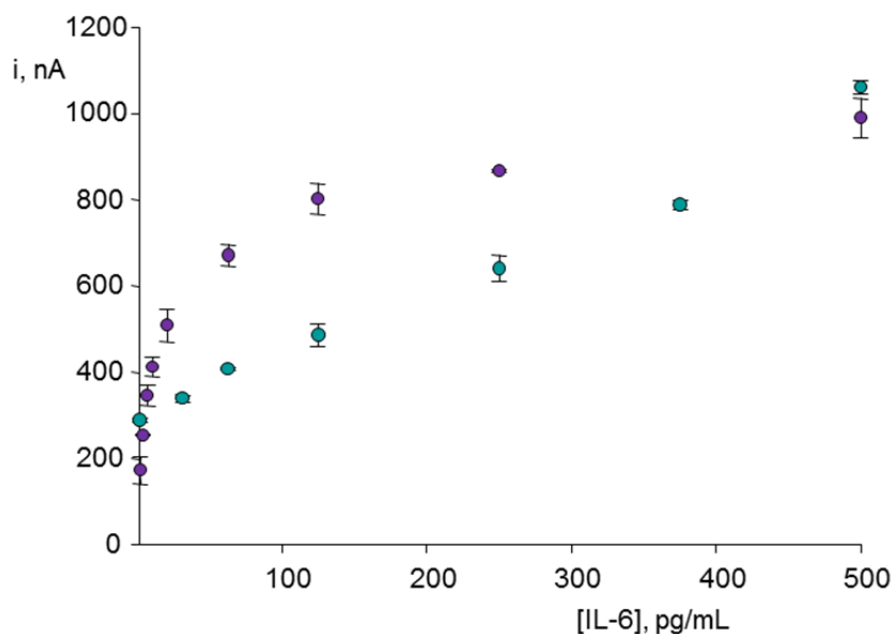
Empleando las condiciones experimentales optimizadas previamente, se construyeron las curvas de calibrado para interleucina 6 utilizando los magnetoinmosensores desarrollados, HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs y Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs.

En la configuración tipo sándwich desarrollada, un incremento en la concentración de IL-6 se traduce en una mayor cantidad de biotin-anti-IL-6 inmovilizada sobre las HOOC-MBs modificadas y, por tanto, también del conjugado HRP-Strept o Poli-HRP-Strept, lo que da lugar a un incremento en la respuesta de corriente obtenida. Como puede observarse en la Figura 42a, la respuesta amperométrica obtenida con HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs es directamente proporcional a la concentración de analito. Sin embargo, para la configuración que emplea del polímero de estreptavidina-HRP (Figura 42b), esta dependencia no es lineal con la concentración, sino con el logaritmo de la concentración de proteína. Este último comportamiento es atribuido al impedimento estérico originado por la presencia del polímero, muy voluminoso, fenómeno que se agrava a medida que aumenta la concentración de analito y por tanto, la del anticuerpo biotinilado, dificultando la unión de éste con la estreptavidina del polímero marcado con HRP. Por esa razón y, como era de esperar, en esta última configuración, la saturación tiene lugar a concentraciones inferiores de IL-6, respecto de cuando se emplea el monómero HRP-Strept.



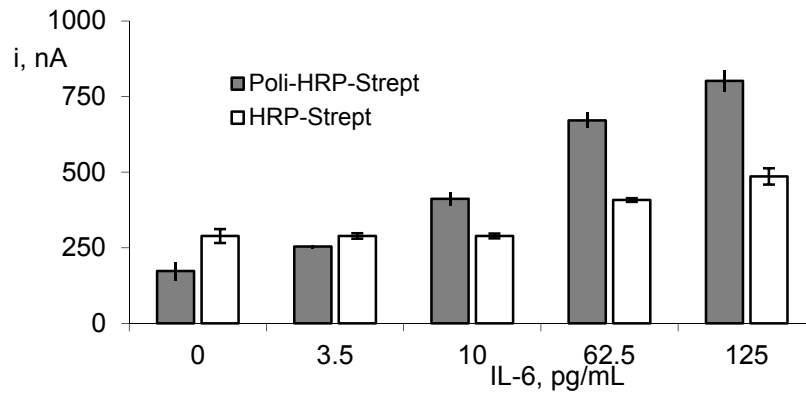
**Figura 42.** Calibrado de IL-6 obtenido con el magnetoinmosensores a) HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs y b) Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs

Lo comentado anteriormente se observa de forma muy clara en la Figura 43, que muestra la superposición de ambos calibrados en el intervalo de linealidad obtenido cuando se emplea para la detección el polímero Poli-HRP-Strept.



**Figura 43.** Superposición de los calibrados de IL-6 empleando los magnetoinmosensores desarrollados: Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs (●) y HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs (●).

Asimismo, la representación de la Figura 44 permite apreciar que los magnetoinmosensores preparados empleando ambos conjugados de estreptavidina-HRP proporcionan calibrados analíticamente útiles en diferentes intervalos de concentraciones de IL-6. Lo más interesante es que cuando se emplea el polímero de estreptavidina-HRP, la variación más significativa en la corriente medida se produce para la variación de las concentraciones de antígeno más bajas, lo que significa una mayor pendiente del calibrado en esa zona y, por tanto, una mayor sensibilidad. Esto se aprecia mejor en la Tabla 21, en la que se comparan las características analíticas de los calibrados obtenidos empleando o no la estrategia de amplificación de la señal. Como puede observarse, en presencia de Poli-HRP-Strept, el intervalo de concentraciones se extiende hasta un valor considerablemente más bajo, 1.75 pg/mL, que la menor concentración que se alcanza cuando se utiliza el monómero HRP-Strept, 31.25 pg/mL.



**Figura 44.** Comparación de las señales obtenidas en el intervalo de concentraciones de IL-6 entre 0 y 125 pg/mL, empleando los magnetoinmosensores desarrollados: Poli-HRP-Strept/ /biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs y HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/ /HOOC-MBs.

**Tabla 21.- Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con los magnetoinmosensores para la determinación de interleucina 6**

<i>HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/ /HOOC-MBs</i>		<i>Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/ /HOOC-MBs</i>	
Ecuación	$y = a * [IL-6] + b$	Ecuación	$y = a * \text{Log} [IL-6] + b$
Intervalo lineal, pg/mL	31.25 - 800 $r = 0.997$	Intervalo lineal, pg/mL	1.75 - 500 $r = 0.999$
Pendiente, $\mu\text{A}$	$1.42 \pm 0.04$	Pendiente, $\mu\text{A}$	$336 \pm 6$
Ordenada, $\mu\text{A}$	$300 \pm 15$	Ordenada, $\mu\text{A}$	$75 \pm 9$
		s, punto en ausencia de IL-6 (n=10), pg/mL	0.13

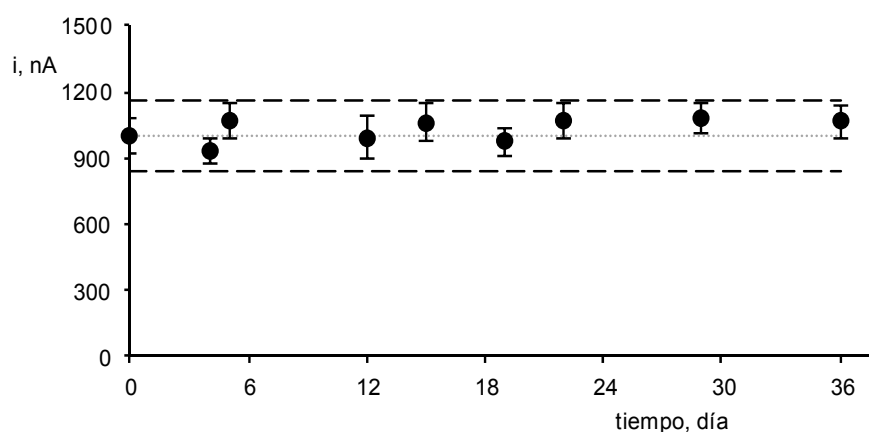
Por otro lado, el límite de detección obtenido con la configuración basada en el empleo del polímero fue de 0.39 pg/mL. Este valor fue calculado con el criterio de  $3s_b$ , donde  $s_b$  es la desviación estándar de 10 medidas del blanco expresada en unidades de concentración,  $s = \pm 0.13$  pg/mL. Cuando se comparó este resultado con los límites de detección de otros inmosensores descritos hasta la fecha, se comprobó que el obtenido figuraba entre los más bajos (ver Tabla 8 de la Introducción).

### **Reproducibilidad y tiempo de vida**

Para llevar a cabo los estudios de reproducibilidad se realizaron 8 medidas repetidas en el mismo día y en diferentes días de trabajo, empleando magnetoinmosensores diferentes para IL-6 a dos niveles de concentración, 60 y

500 pg/mL. Los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos para los dos niveles de concentración de IL-6 indicados anteriormente fueron de 8.1 y 6.9% para medidas realizada el mismo día y de 8.4 y 7.2% cuando las medidas se realizaron en diferentes días. Estos valores demuestran que el proceso de fabricación del inmunosensor es fiable y que las respuestas obtenidas con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera son reproducibles.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad del conjugado anti-IL-6/HOOC-MBs, tras el bloqueo con etanolamina. Para ello, se prepararon varios inmunoconjugados el mismo día y se almacenaron a 4°C en 25 µL de disolución reguladora fosfato 0.1 M de pH 7.4, conteniendo Tween 20 al 0.01 % (PBST), en presencia de 0.1% BSA y 0.1% azida como conservante. Cada día se preparaban los magnetoinmunosensores Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs y se medía la respuesta para 500 pg/mL de IL-6. En la Figura 45 se representa un gráfico de control tomando como valor central el valor medio obtenido para las tres medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio y como límites de control superior e inferior el triple de la desviación estándar de estas medidas. Las respuestas amperométricas permanecieron dentro de los límites de control durante al menos 36 días, sin pérdida significativa de la sensibilidad inicial durante el periodo de estudio, lo cual demostró un excelente tiempo de vida del inmunoconjugado anti-IL-6/HOOC-MBs. Este hecho es muy importante desde el punto de vista práctico ya que permite la preparación de los conjugados anti-IL-6/HOOC-MBs y su almacenaje hasta el momento de ser utilizados.

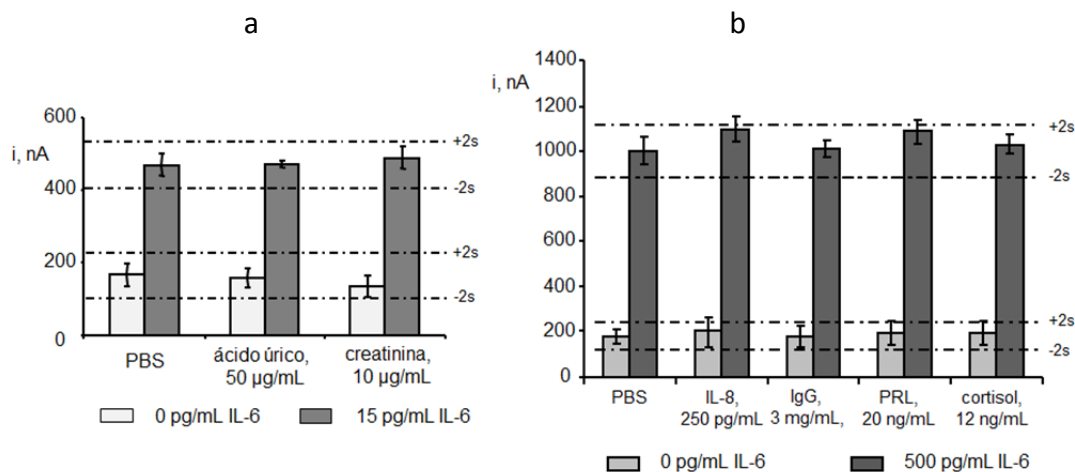


**Figura 45.** Estabilidad del conjugado anti-IL-6/HOOC-MBs tras el bloqueo con etanolamina y almacenado a 4°C en PBST en presencia de 0.1% BSA y 0.1% azida. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en presencia de 500 pg/mL de IL-6.

### 5.1.2.5. Selectividad del magnetoinmunsensor

Para evaluar la selectividad del inmunsensor se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de 15  $\mu\text{g/mL}$  de IL-6 para disoluciones que contienen 50  $\mu\text{g/mL}$  de ácido úrico o 10  $\mu\text{g/mL}$  de creatinina, sustancias que se encuentran junto con el analito de interés en muestras de orina.

También se evaluó la reactividad cruzada frente a compuestos que pueden encontrarse presentes en muestras de saliva (interleucina 8 (IL-8), IgG, prolactina (PRL) y cortisol) a niveles fisiológicos. Para ello se cotejaron las respuestas del magnetoinmunsensor obtenidas para 0 y 500  $\text{pg/mL}$  de IL-6, en ausencia y en presencia de cada compuesto testado. Como se observa en la Figura 46, ninguna de las sustancias ensayadas representaba una interferencia significativa en la determinación de IL-6 con el magnetoinmunsensor descrito.



**Figura 46.** Estudio de reactividad cruzada. a) especies potencialmente interferentes en muestras de orina. b) especies potencialmente interferentes en muestras de saliva

### 5.1.2.6. Aplicación del magnetoinmunsensor Poli-HRP-Strept/biotin-anti-IL-6/IL-6/anti-IL-6/HOOC-MBs a la determinación de interleucina 6 en orina y saliva

Para demostrar la aplicabilidad del magnetoinmunsensor desarrollado al análisis de muestras de interés clínico, se puso a punto un método de determinación de IL-6 en orina enriquecida con 15, 30 y 60  $\text{pg/mL}$  de IL-6. Para ello se empleó un control químico de orina que contiene los siguientes componentes: amilasa, calcio, cloruro, cortisol, creatinina, glucosa, magnesio, microalbúmina (albúmina), fósforo, potasio, sodio, urea, urea nitrogenada y ácido úrico.

También se evaluó la utilidad del magnetoinmuno sensor para la determinación de IL-6 en muestras de saliva, empleando para ello saliva procedente de 3 voluntarios (fumador, no fumador y paciente de periodontitis) comparándose los resultados obtenidos con los proporcionados por un kit ELISA comercial.

### Orina

Las muestras de orina contaminadas con IL-6 se analizan directamente. Únicamente fue necesario ajustar el pH a 7.4, ya que de lo contrario, como se observa en la Figura 47, se produce un descenso en la señal de corriente obtenida. Este hecho se debe, probablemente, a la repulsión electrostática entre el anti-IL-6 y el analito ya que al pH 5 de la muestra de orina, ambas proteínas se encuentran por debajo de su punto isoeléctrico.

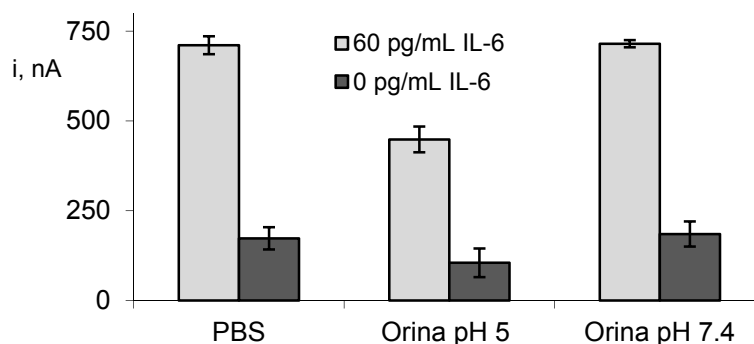
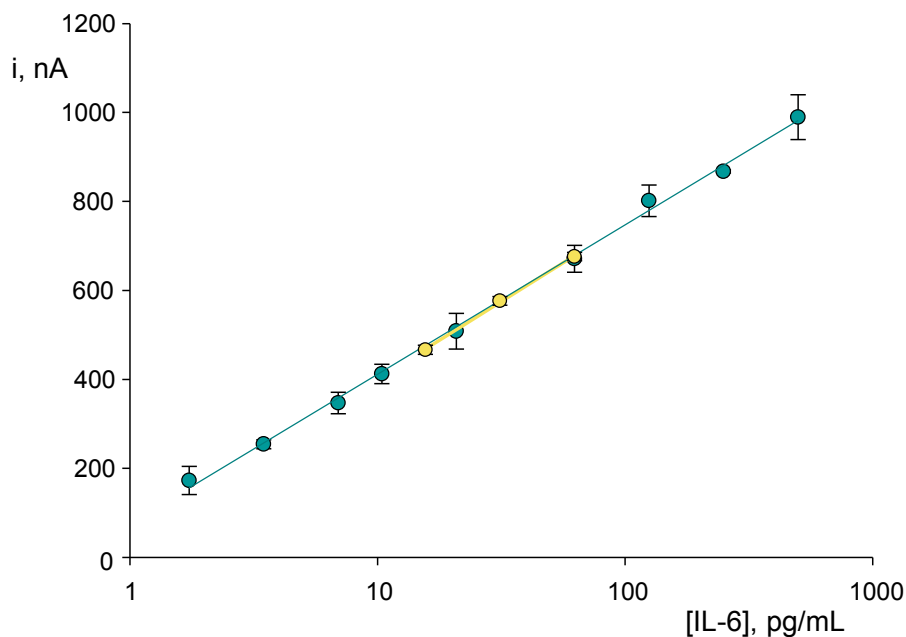


Figura 47. Estudio de la influencia del pH de la orina

Con el fin de confirmar la ausencia de efecto matriz, se evaluó la respuesta del inmunosensor para las muestras de orina enriquecidas con IL-6 (15, 30 y 60 pg/mL). En la Figura 48 se han representado los valores de intensidad de corriente obtenidos para las muestras analizadas, superpuestos en el calibrado de patrones, encontrándose un ajuste perfecto entre ambos conjuntos de resultados. Las pendientes de los tramos lineales son  $(347 \pm 9)$  y  $(336 \pm 6)$  nA para el calibrado en orina y con disoluciones patrón, respectivamente, pudiendo demostrarse que no existen diferencias significativas entre dichos valores ( $t_{\text{exp}} = 1.017 < t_{\text{tab}} = 2.306$ ). Este resultado significa que la determinación de IL-6 en orina puede llevarse a cabo por interpolación directa en el calibrado de patrones, tras un simple ajuste del pH de la orina a 7.4 por adición de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Las concentraciones medias encontradas para las

muestras fueron de  $14.6 \pm 0.9$ ;  $31 \pm 2$  y  $61 \pm 4$  pg/mL, que corresponden a recuperaciones entre 98 y 103%.



**Figura 48.** Superposición de las señales obtenidas para la muestra de orina al calibrado de patrones

### **Saliva**

La toma de muestra de saliva se realiza empleando un hisopo que posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min. La determinación de IL-6 se realiza sin ningún tipo de tratamiento. Primeramente, se realizó un calibrado mediante adiciones estándar para evaluar la existencia de efecto matriz, llevando a cabo adiciones de IL-6 entre 25 y 200 pg/mL a la muestra de saliva del paciente con periodontitis. La comparación de la pendiente obtenida ( $330 \pm 24$ ) nA con la del calibrado de patrones ( $336 \pm 6$ ) nA puso de manifiesto la posibilidad de llevar a cabo la determinación de IL-6 por interpolación en el calibrado con patrones. De igual manera, se comprobó la ausencia de efecto matriz para las otras dos muestras de saliva.

Las concentraciones de IL-6 encontradas fueron de  $41 \pm 2$ ,  $36 \pm 3$  y  $16 \pm 2$  pg/mL, para el paciente con periodontitis, el voluntario fumador y el no fumador, respectivamente, las cuales se encuentran dentro del intervalo de concentración de IL-6 en este tipo de muestras [Ebersola, 2013; Hamad, 2011; Carrillo de Albornoz, 2006].

Con el fin de demostrar la validez del método propuesto, se compararon los resultados obtenidos con los proporcionados por un kit ELISA comercial para la determinación de IL-6 en éste y otros tipos de fluidos corporales. Los valores obtenidos empleando el kit fueron  $40 \pm 1$ ,  $33 \pm 2$  y  $14 \pm 2$  pg/mL, para el paciente con periodontitis, voluntario fumador y para el no fumador, respectivamente. El análisis estadístico de los valores de concentración obtenidos para cada paciente y técnica de análisis demostró que no existían diferencias significativas entre ellos, ya que los valores de  $t_{\text{exp}}$  calculados, 1.432, 1.888 y 0.597, fueron menores al valor de  $t_{\text{tab}}$  en todos los casos (3.182) para un nivel de confianza del 95%.

Merece la pena destacar que el tiempo de ensayo del método ELISA es de unos 3 días, mientras que empleando el magnetoinmunoensayo el análisis se lleva a cabo en unas 4 horas. Además, el intervalo de linealidad del kit ELISA comercial, de 6.25 a 200 pg/mL, es más estrecho que el del magnetoinmunoensayo desarrollado en este trabajo. Estas ventajas ponen de manifiesto la relevancia desde un punto de vista práctico de la metodología desarrollada.

### 5.1.2.7. Conclusiones

Se ha desarrollado un magnetoinmunoensayo electroquímico de bajo coste para la determinación sensible de interleucina 6 en muestras biológicas. La elevada sensibilidad alcanzada puede atribuirse, por una parte, a la inmovilización covalente del anticuerpo sobre la superficie de micropartículas magnéticas, llevando a cabo la determinación mediante un ensayo tipo sándwich que implica el uso de un segundo anticuerpo biotinilado y estreptavidina marcada con la enzima peroxidasa y, por otra parte, a la sustitución de este último reactivo por un esqueleto polimérico que tiene anclado un elevado número de moléculas de estreptavidina y de la enzima peroxidasa, lo que constituye una novedosa estrategia de amplificación de la señal.

Las características analíticas en términos de sensibilidad, selectividad, intervalo de linealidad y reproducibilidad son comparables o mejores a las de otros inmunoensayos o inmunoensayos descritos en la bibliografía. Además, la elevada estabilidad de los conjugados anti-IL-6/HOOC-MBs posibilita su preparación previa y

almacenaje en las condiciones anteriormente indicadas hasta el momento de su utilización, lo que se traduce en una disminución del tiempo de análisis.

Por último, cabe señalar que la metodología desarrollada ha demostrado ser una estrategia sencilla para la determinación de interleucina 6 en muestras de interés clínico como saliva y orina, lo que resulta de gran utilidad en la discriminación y el diagnóstico temprano de enfermedades orales y renales. Hasta el momento no se ha descrito en la bibliografía ningún inmunosensor adecuado para la determinación de IL-6 en este tipo de muestra.



### 5.1.3. Magnetoinmunosensores para ceruloplasmina

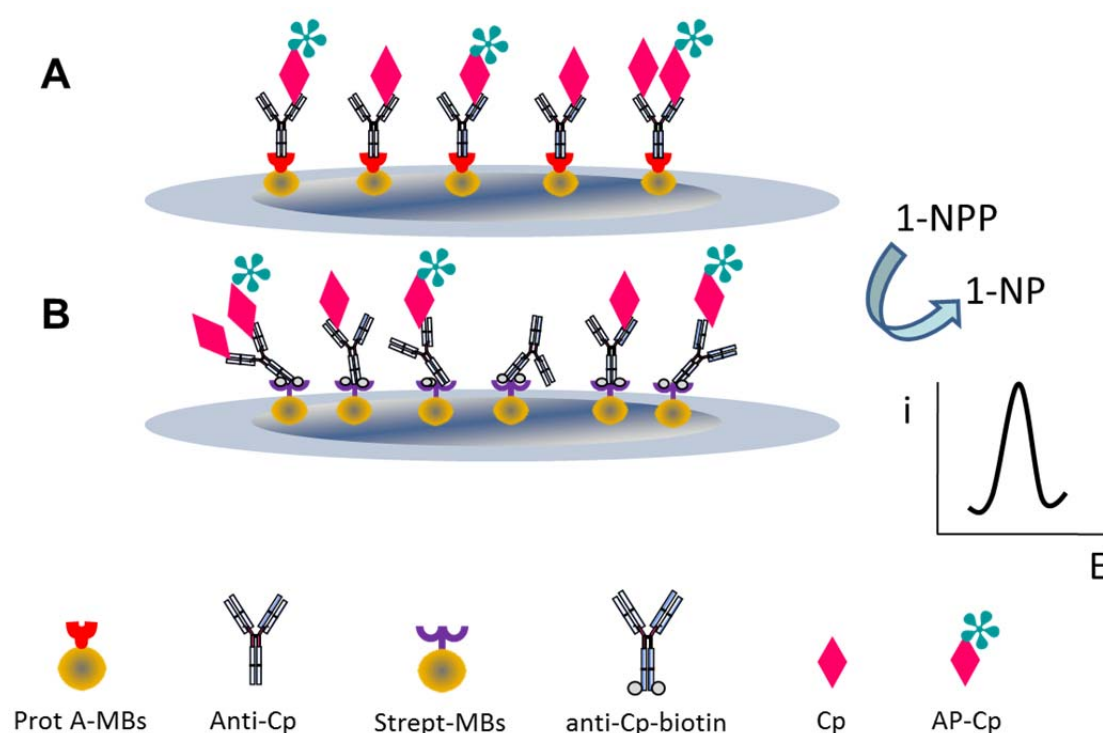
La ceruloplasmina es una  $\alpha_2$ -glicoproteína transportadora de cobre en el plasma. Los niveles de esta proteína aumentan después de procesos inflamatorios y traumáticos, perteneciendo por tanto a la familia de las proteínas sensibles a la inflamación. Los niveles normales de ceruloplasmina en sangre están en el intervalo de 18 a 131  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para recién nacidos, siendo en mujeres de 210 a 440  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en hombres de 180 a 410  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En los siguientes apartados se comparan dos configuraciones de magnetoinmunosensores de tipo competitivo directo para la determinación de ceruloplasmina en suero que se diferencian en el modo de inmovilización del anticuerpo de captura. Ambas configuraciones hacen uso de reacciones de afinidad, la primera de ellas emplea partículas magnéticas modificadas con proteína A, permitiendo la inmovilización orientada del anticuerpo. La segunda, utiliza partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, dando lugar a una inmovilización al azar del anticuerpo de captura biotinilado.

Como se verá a continuación, las diferentes estrategias de inmovilización del anticuerpo van a proporcionar a los magnetoinmunosensores características analíticas distintas en términos de sensibilidad e intervalo de linealidad, así como diferencias en el efecto matriz existente en la muestra de suero.

### 5.1.3.1. Configuración de los magnetoinmosensores

Como puede observarse en la Figura 49, en los dos magnetoinmosensores se ha optado por una configuración de tipo competitivo directo, empleando bien un anticuerpo de captura sin marcar (anti-Cp) o uno biotinilado (anti-Cp-biotin). Posteriormente, se realiza la etapa de competición entre la ceruloplasmina (Cp) presente en la muestra y el análogo marcado con fosfatasa alcalina (AP-Cp) por los sitios de unión del anticuerpo. La detección electroquímica se lleva a cabo empleando 1-naftilfosfato como sustrato enzimático y, tras 5 minutos de hidrólisis enzimática, se registra la respuesta de oxidación del 1-naftol generado mediante voltamperometría diferencial de impulsos.



**Figura 49.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del magnetoinmosensores AP-Cp/anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE (A) y AP-Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE (B).

Como puede observarse en la Figura 49, la diferencia entre ambas configuraciones radica en la inmovilización del anticuerpo de captura. Cuando se emplean partículas magnéticas modificadas con proteína A, la inmovilización se realiza de forma orientada a través de la región Fc del anticuerpo, dejando la zona de reconocimiento del antígeno accesible a la disolución [Antibodies, 1988]. En la configuración basada en el uso de partículas funcionalizadas con estreptavidina, la

inmovilización del anticuerpo se produce al azar debido a la distribución aleatoria de las moléculas de biotina en el anticuerpo de captura. Sin embargo, la interacción estreptavidina-biotina es extremadamente fuerte, muy rápida y prácticamente irreversible. Además, este tipo de inmovilización preserva con más efectividad la función biológica de las moléculas inmovilizadas que otras alternativas [Darain, 2003; Díaz-González, 2005].

### 5.1.3.2. Optimización de las variables experimentales del inmunosensor preparado con Prot A-MBs

Con el fin de obtener las mejores características analíticas para la determinación de ceruloplasmina, se han optimizado las distintas variables experimentales implicadas en el desarrollo del inmunosensor con los resultados que se describen a continuación.

A modo de resumen en la Tabla 22 se recogen las variables estudiadas, los intervalos considerados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

Tabla 22.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del magnetoinmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE.

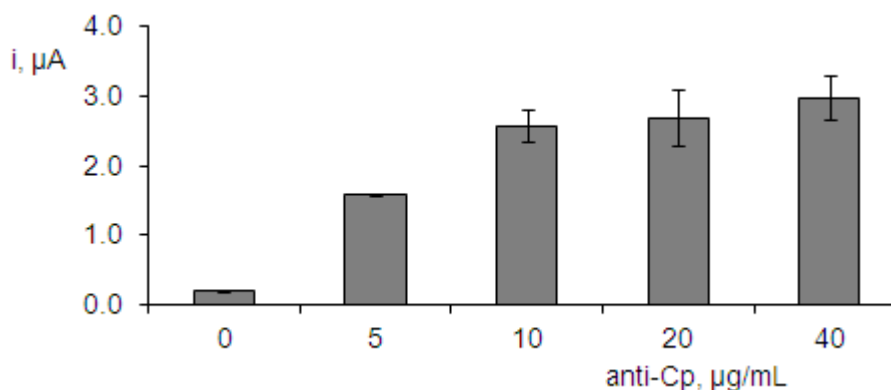
Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
anti-Cp, $\mu\text{g/mL}$	1 – 40	2.5
$t_{\text{inc anti-Cp}}$ , min	15 – 60	15
AP-Cp, $\mu\text{g/mL}$	1 - 50	5
$t_{\text{competición}}$ , min	15 - 60	30
1-naftilfosfato, mM	0.5 - 100	5
$t_{\text{hidrólisis}}$ , min	0 - 12	5

#### ***Influencia de la concentración de anti-Cp***

La concentración de anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas se optimizó inmovilizando 25  $\mu\text{L}$  de diferentes disoluciones de anti-Cp preparadas en el intervalo de concentraciones de 0 a 40  $\mu\text{g/mL}$ , durante 1 hora. Los conjugados de partículas magnéticas anti-Cp/Prot A-MBs se incubaron en AP-Cp 2  $\mu\text{g/mL}$  durante 1 h y las medidas en DPV se realizaron depositando las partículas magnéticas

modificadas sobre un electrodo serigrafiado de carbono en presencia de 1-naftilfosfato 5 mM tras un tiempo de reacción de 8 min.

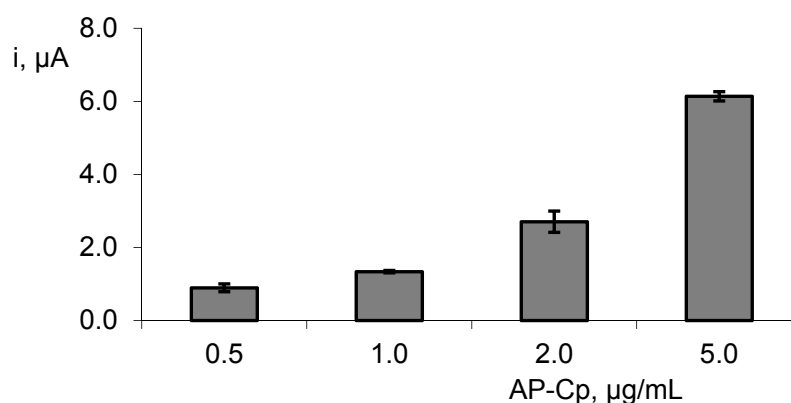
Los resultados obtenidos (Figura 50) muestran el aumento de la corriente de pico a medida que aumenta la cantidad de anticuerpo inmovilizado hasta una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de esta concentración, la corriente se mantiene prácticamente constante.



**Figura 50.** Influencia de la concentración de anti-Cp: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 2  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

#### ***Influencia de la cantidad de AP-Cp***

La concentración de ceruloplasmina marcada con AP necesaria para saturar todos los sitios de unión del anti-Cp inmovilizado fue seleccionada incubando el conjugado de partículas magnéticas anti-Cp/Prot A-MBs en 25  $\mu\text{L}$  de disoluciones de AP-Cp preparadas en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 5  $\mu\text{g/mL}$ , durante 1 hora. Los inmunosensores se prepararon empleando 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 10  $\mu\text{g/mL}$  durante 1 h y 1-naftilfosfato 5 mM, 8 min.

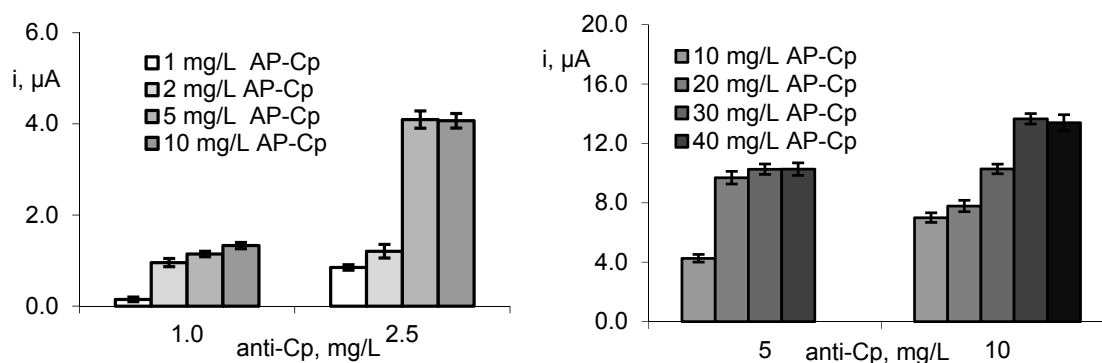


**Figura 51.** Influencia de la concentración de AP-Cp: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 10  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

Como puede observarse en la Figura 51, no se consigue saturar todo el anticuerpo inmovilizado sobre las MBs, ni siquiera empleando una concentración de ceruloplasmina marcada tan alta como 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por esta razón, se decidió realizar la optimización de las concentraciones del anticuerpo de captura y de ceruloplasmina marcada con AP estudiando la variación de la señal obtenida al modificar las variables de forma simultánea, en presencia y en ausencia de ceruloplasmina analito.

### ***Influencia de la concentración de anti-Cp y de la cantidad de AP-Cp***

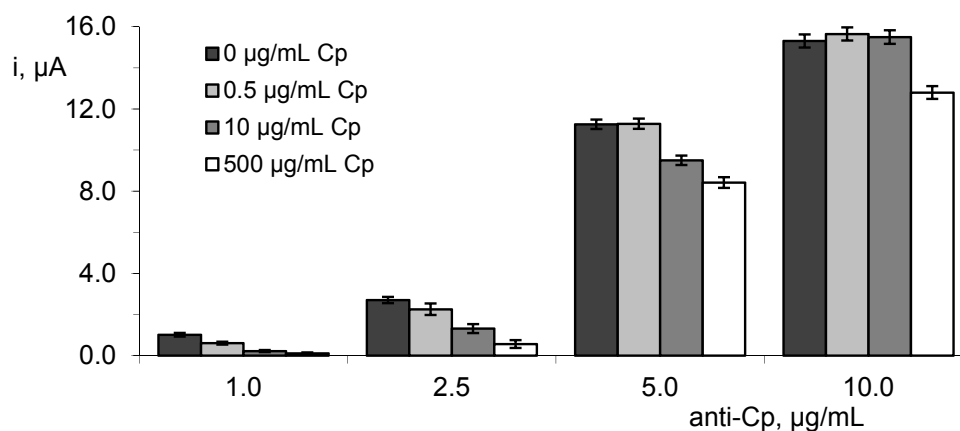
Como puede observarse en la Figura 52, a medida que aumenta la concentración del anticuerpo de captura, la señal de corriente aumenta conforme crece la concentración de ceruloplasmina marcada hasta saturar las posiciones de unión del anticuerpo. Asimismo, como era de esperar, al aumentar la concentración del anticuerpo, mayor es la concentración de ceruloplasmina marcada necesaria para alcanzar dicha saturación, siendo éstas 2, 5, 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para concentraciones del anticuerpo de captura de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.



**Figura 52.** Influencia de la concentración de anti-Cp y AP-Cp en ausencia de ceruloplasmina analito: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

Estudios equivalentes se realizaron en presencia de concentraciones variables de ceruloplasmina analito. En la Figura 53 se muestran las intensidades de pico obtenidas para diferentes magnetoinmosensores preparados empleando 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp de concentraciones 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 25  $\mu\text{L}$  de disoluciones que contienen AP-Cp en concentración 2, 5, 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente y diferentes concentraciones de ceruloplasmina analito. Como puede observarse en la Figura 53, se obtiene una mayor sensibilidad empleando 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-Cp y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-

Cp, lo que puede atribuirse a la menor concentración de analito marcado necesaria para la saturación del anticuerpo primario [Ruth, 2001].



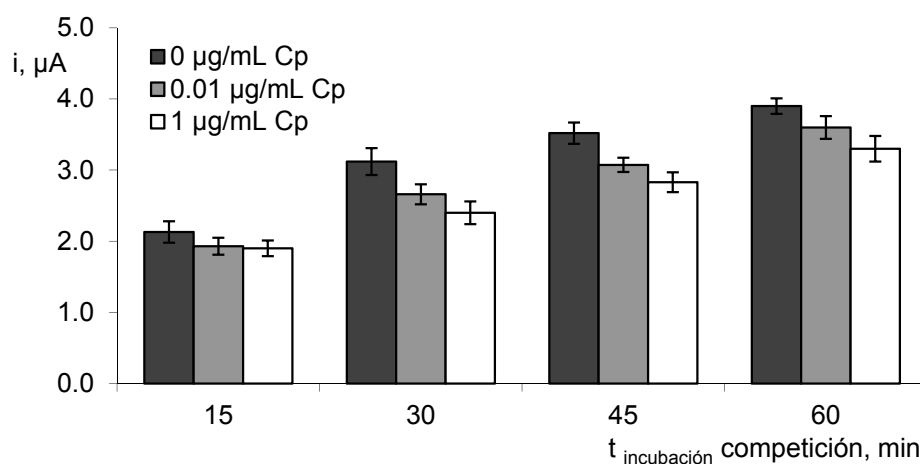
**Figura 53.** Influencia de la concentración de anti-Cp y AP-Cp: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp + Cp (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

#### ***Influencia del tiempo de incubación de anti-Cp***

Una vez optimizada la concentración de anticuerpo de captura se optimizó el tiempo de incubación necesario para su inmovilización, evaluándose la señal obtenida en el intervalo de tiempo de 15 a 60 min, empleando 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de anti-Cp y 5  $\mu\text{g/mL}$  de ceruloplasmina marcada. No se obtuvieron diferencias significativas en las señales alcanzadas, eligiéndose, por tanto, 15 minutos con el fin de reducir en lo posible el tiempo de análisis.

#### ***Influencia del tiempo de competición AP-Cp/Cp***

Otra variable de gran importancia para el desarrollo de un inmunosensor competitivo es el tiempo de incubación de la etapa de competición, eligiéndose el valor que proporcione la mayor sensibilidad, es decir, una elevada señal que, a su vez, permita la diferenciación entre las señales obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de analito. El tiempo de incubación en la disolución mezcla de Cp y AP-Cp 5  $\mu\text{g/mL}$  se optimizó midiéndose las respuestas voltamperométricas a diferentes tiempos en ausencia de Cp y en presencia de 0.01 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de analito (Figura 54). Los resultados obtenidos a 30 min de incubación son los que muestran una mayor diferencia entre el punto cero del calibrado y el de 0.1 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de Cp, siendo elegido como óptimo para que se establezca la competición entre la Cp y la misma marcada con fosfatasa alcalina.

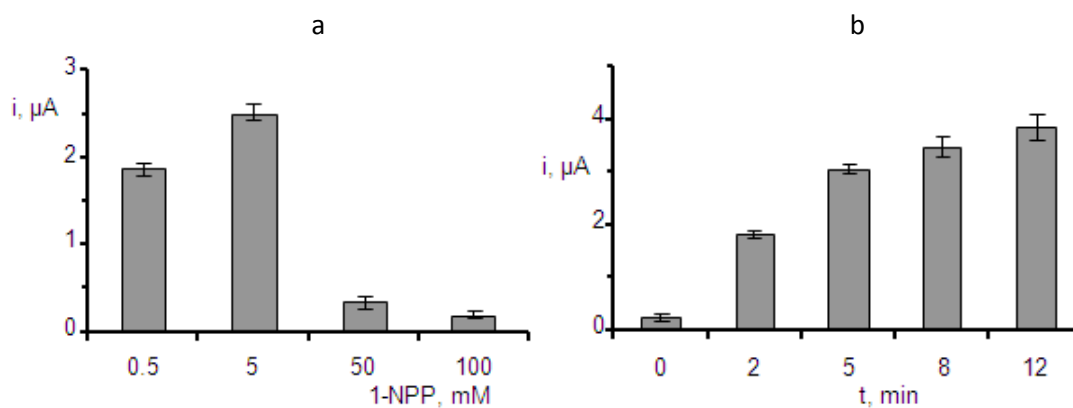


**Figura 54.** Influencia del tiempo de competición: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MB; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + Cp 0.01 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

#### ***Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato y del tiempo de hidrólisis***

Se estudió la influencia de la concentración de 1-naftilfosfato sobre la respuesta de oxidación en voltamperometría diferencial de impulsos registrada en el intervalo de potenciales comprendido entre -0.15 y 0.60 V. Los resultados obtenidos (Figura 55) muestran el aumento de la corriente a medida que lo hace la concentración de sustrato hasta un valor de 5 mM, decreciendo para valores superiores. A partir de esta concentración, la señal de corriente disminuye rápidamente, como ya se ha comentado debido probablemente al ensuciamiento del electrodo por los productos generados en la oxidación electroquímica. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de 1-naftilfosfato 5 mM.

En estas condiciones, se estudió también el tiempo necesario para que se produzca la reacción enzimática. Los resultados que aparecen representados en la Figura 55 muestran un aumento de la corriente de oxidación con el tiempo de reacción. Consecuentemente, como solución de compromiso entre una buena sensibilidad y un corto tiempo de análisis, se escogió un tiempo de 5 minutos para el óptimo funcionamiento del inmunosensor.



**Figura 55. a)** Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato: 1  $\mu\text{L}$  de Prot A-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (30 min); 1-naftilfosfato (5 min.) **b)** Influencia del tiempo de hidrólisis: 1  $\mu\text{L}$  de MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (30 min); 1-naftilfosfato 5 mM.

### 5.1.3.3. Optimización de las variables experimentales del inmunosensor preparado con Strept-MBs

Al igual que en la configuración anterior basada en el empleo de partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A, en los apartados siguientes se estudia la influencia de las variables que afectan a la preparación del inmunosensor y a la determinación de Cp utilizando partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, Strept-MBs.

A modo de resumen, en la Tabla 23 se recogen las variables estudiadas, los intervalos valorados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

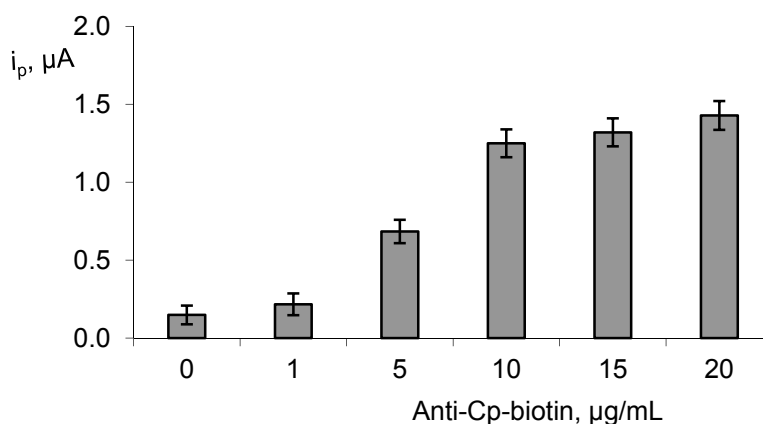
*Tabla 23.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE*

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
anti-Cp-biotin, $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 - 20	10
$t_{\text{inc}}$ anti-Cp-biotin, min	0 - 60	15
AP-Cp, $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 - 5	1
$t_{\text{competición}}$ , min	15 - 60	30
1-naftilfosfato, mM	0.5 - 100	5
$t_{\text{hidrólisis}}$ , min	0 - 12	5

### ***Influencia de la concentración y tiempo de incubación de anti-Cp biotinilado***

Como ya se ha comentado, la optimización de la concentración del anticuerpo inmovilizado sobre las MBs desempeña un papel clave en el funcionamiento del inmunosensor. Para su elección, se midieron las señales obtenidas mediante voltamperometría diferencial de impulsos de diferentes inmunosensores preparados por incubación de 30  $\mu\text{g}$  (3  $\mu\text{L}$ ) de la suspensión de partículas magnéticas Strept-MBs en 25  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de captura de concentraciones comprendidas entre 1 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 1 hora. Además se incluyó una etapa de bloqueo con 25  $\mu\text{L}$  de una disolución que contiene BSA 2.5% y biotina 1.5 mM durante 30 minutos.

Los resultados obtenidos (Figura 56) muestran un aumento de la corriente de pico con la concentración de la disolución de anticuerpo hasta 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , permaneciendo prácticamente constante a partir de este valor. Con el fin de reducir en lo posible el gasto de reactivo se elige una concentración de anticuerpo biotinilado de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



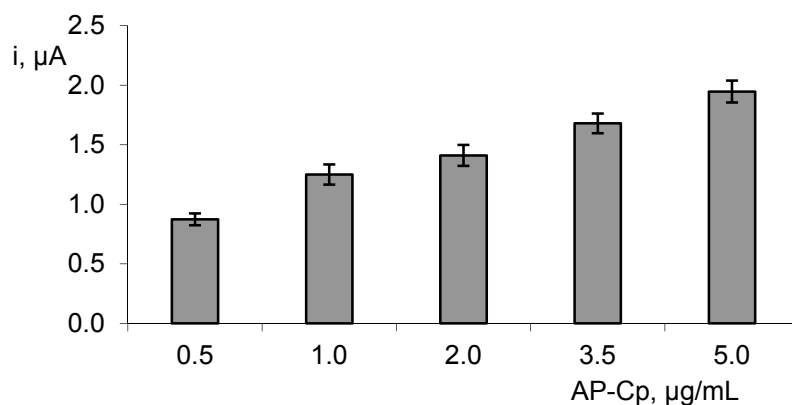
**Figura 56.** Influencia de la concentración de anti-Cp-biotin: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de BSA 2.5%/Biotina 1.5 mM (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

El tiempo de incubación de esta etapa se estudió midiendo la respuesta obtenida en el intervalo comprendido entre 15 y 60 minutos. La corriente de pico fue similar en todas las medidas realizadas, por lo que se eligió el menor valor con el fin de reducir el tiempo de análisis.

### ***Influencia de la cantidad de AP-Cp***

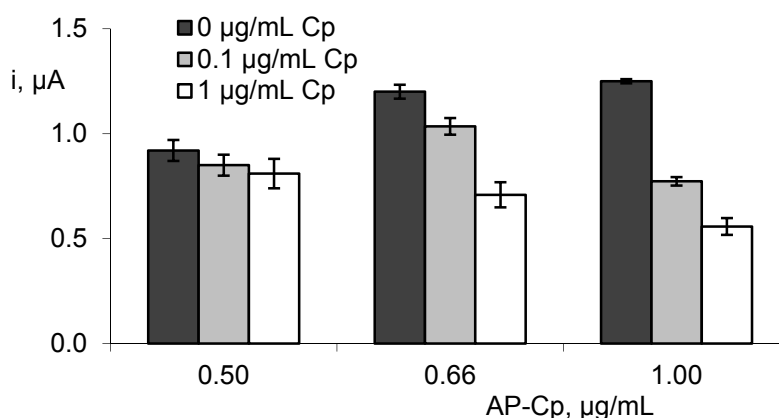
Una vez elegida la cantidad de anticuerpo biotinilado, se optimizó la concentración de AP-Cp necesaria para saturar todos los epítomos del anticuerpo de

captura. Para ello se prepararon diferentes magnetoinmunosensores incubando durante 1 hora el conjugado de anti-Cp-biotin/Strept-MBs en 25  $\mu\text{L}$  de disoluciones del antígeno marcado, AP-Cp, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como se observa en la Figura 57, la señal aumenta al aumentar la concentración de ceruloplasmina marcada, siendo más acusado el incremento al pasar de 0.5 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-Cp que de 1 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que cabe esperar que la saturación del anticuerpo se produzca a una concentración próxima a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-Cp. El aumento producido para 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-Cp puede deberse al aumento de adsorciones inespecíficas al tratarse de una concentración muy superior a la que produce la saturación.



**Figura 57.** Influencia de la concentración de AP-Cp: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de BSA 2.5%/Biotina 1.5 mM (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp (60 min).

A continuación se realizaron estudios en ausencia y en presencia de ceruloplasmina analito en concentraciones de 0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  empleando concentraciones de AP-Cp entre 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con el fin de elegir la concentración de ceruloplasmina marcada que proporcione la mayor diferencia entre las señales obtenidas en ausencia y en presencia de ceruloplasmina, indicativo de una mayor competencia entre el antígeno y el antígeno marcado por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Como puede observarse en la Figura 58 la mayor diferencia de señales se obtiene empleando 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-Cp. Esto puede deberse a que concentraciones menores de AP-Cp no saturan todas las posiciones de unión del anticuerpo al antígeno, y parte de la Cp libre se une directamente al anticuerpo de captura sin necesidad de establecerse competición con la Cp marcada.



**Figura 58.** Influencia de la concentración de AP-Cp en la competición: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de BSA 2.5%/Biotina 1.5 mM (30 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp/Cp (60 min); 1-Naetilfosfato 5 mM (8 min).

Es interesante remarcar que las concentraciones óptimas del anticuerpo de captura y de AP-Cp son diferentes de las elegidas para la preparación de los magnetoinmunosensores basados en el empleo de partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A. Es posible que esto sea debido a las diferencias en la capacidad de los dos tipos de partículas magnéticas funcionalizadas para la inmovilización adecuada del anticuerpo de captura. Es decir, cuando se utilizan partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A, la inmovilización del anticuerpo tiene lugar de forma orientada a través de la región Fc y, por ello, la concentración seleccionada es menor. Asimismo, se necesita una concentración superior de AP-Cp para saturar las posiciones de unión al anticuerpo de captura. Por otro lado, cuando se emplean partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, la inmovilización del anticuerpo tiene lugar al azar, dada la situación aleatoria de los grupos biotinilados en el anticuerpo de captura y, en consecuencia, es necesaria una concentración más alta de anticuerpo para aumentar la proporción de los orientados adecuadamente. Por otra parte, a su vez, se necesita una menor concentración de AP-Cp para la saturación de los sitios de unión al anticuerpo, al no estar accesibles a la disolución del antígeno todos los epítomos de los anticuerpos inmovilizados.

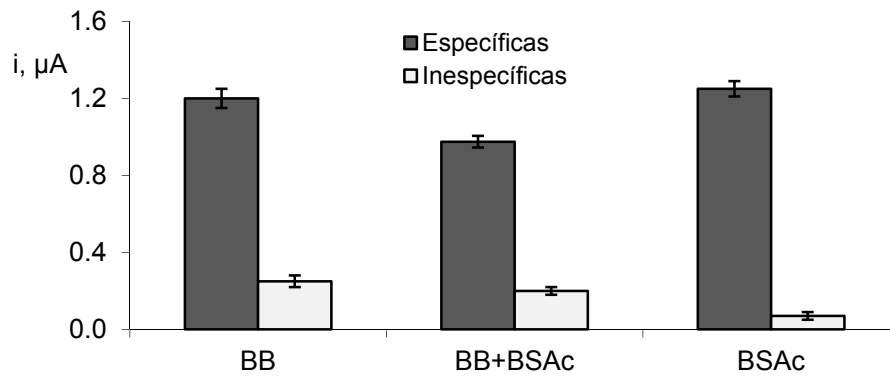
#### ***Influencia del tipo de bloqueo***

Para mejorar la relación entre la señal específica e inespecífica se han realizado diversos estudios con el fin de bloquear las posiciones reactivas de las

partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina en presencia y en ausencia del anticuerpo biotinilado. Para ello, las partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo biotinilado de captura se incubaron en una disolución que contiene BSA 2.5% y biotina 1.5 mM (BB) durante 30 min, con el fin de saturar las posiciones de estreptavidina libre de la superficie de las partículas magnéticas y, posteriormente, en una disolución de ceruloplasmina marcada con fosfatasa alcalina. Las señales inespecíficas se obtuvieron aplicando el mismo procedimiento pero en ausencia del anticuerpo de captura. De esta forma, la señal inespecífica es el 20.8% de la específica (Figura 59, BB).

Con el fin de disminuir en mayor proporción la magnitud de las señales inespecíficas, se estudió el efecto de la presencia de un agente bloqueante en la disolución del conjugado enzimático de ceruloplasmina. Para ello se realizaron medidas preparando magnetoinmosensores en presencia y en ausencia del anticuerpo biotinilado, incluyendo un 2% de BSA en la mezcla de Cp y AP-Cp. En la Figura 59 (BB+BSAc) se observa una disminución tanto de la señal específica como de la inespecífica respecto de las medidas obtenidas empleando únicamente la disolución bloqueante BB, obteniéndose una relación entre ambas señales similar (20.5%).

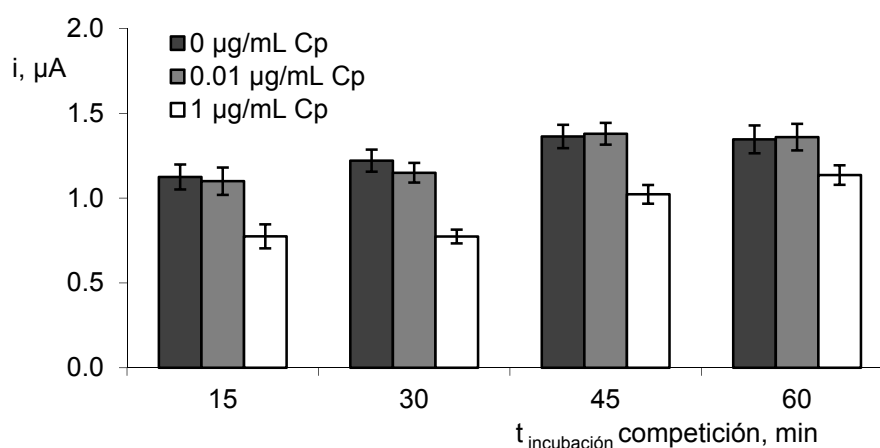
Finalmente, se realizaron medidas sin la etapa bloqueante BB pero adicionando BSA al 2% a la disolución de ceruloplasmina marcada. En este caso, la señal específica fue muy similar a la obtenida empleando la disolución bloqueante BB, sin embargo la señal inespecífica fue mucho menor, suponiendo sólo un 5.6 % de la específica (Figura 59, BSAc). Por esta razón, los experimentos posteriores se realizaron en ausencia de la etapa de incubación en la disolución bloqueante y en presencia de un 2% de BSA en la disolución mezcla de Cp y AP-Cp, lo que reduce el tiempo de preparación del magnetoinmosensores en 30 minutos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores [Centi, 2008].



**Figura 59.** Estudio del tipo de bloqueo.- BB: disolución de bloqueo que contiene BSA 2.5% y biotina 1.5 mM; BSAc: competición en presencia de BSA 2%; BB + BSAc: disolución de bloqueo + competición en presencia de BSA. 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp (60 min); 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

### ***Influencia del tiempo de competición AP-Cp/Cp***

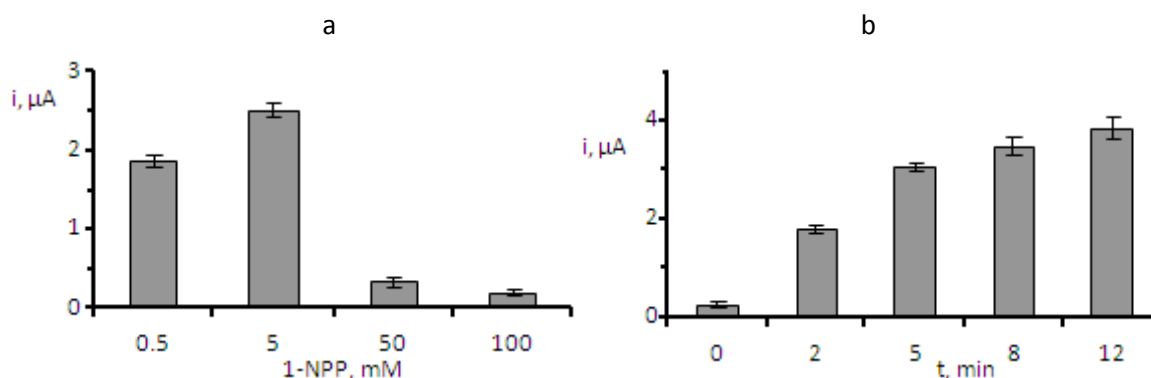
Al igual para el magnetoinmunsensor que utiliza partículas magnéticas modificadas con proteína A, se realizó un estudio para seleccionar el tiempo de incubación en la mezcla Cp y AP-Cp empleando disoluciones que contienen una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AP-Cp y concentraciones de 0, 0.01 ó 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ceruloplasmina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 60. Como puede observarse, para 30 min de incubación se produce una mayor diferencia entre la intensidad de corriente correspondiente al punto cero del calibrado (sin competición) y la obtenida para una concentración de Cp de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por esta razón, se ha elegido este valor como tiempo de competición óptimo.



**Figura 60.** Influencia del tiempo de competición: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 60 min; 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + Cp 0, 0.01 ó 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en BSA 2%; 1-naftilfosfato 5 mM (8 min).

### ***Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato y del tiempo de hidrólisis***

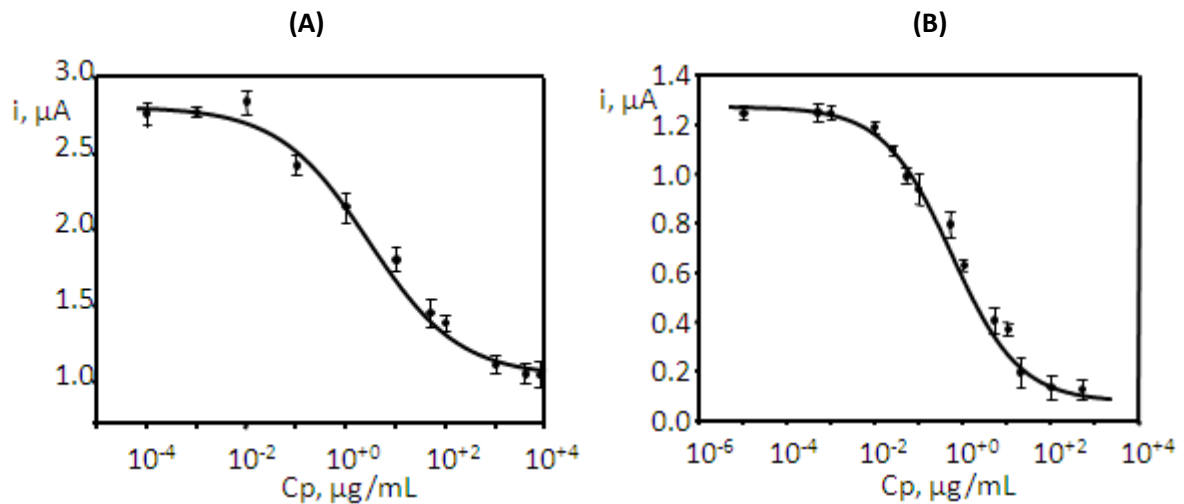
A continuación se estudió la influencia de la concentración del sustrato de la reacción enzimática sobre la respuesta del inmunosensor, en el intervalo comprendido entre 0.5 y 100 mM. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 61a. Como era de esperar, la tendencia observada es similar a la de la Figura 55, y se ha escogido también 5 mM como concentración óptima. En cuanto al tiempo de hidrólisis enzimática, se escogieron 5 minutos como tiempo óptimo al igual que en la configuración anterior (Figura 61b).



**Figura 61. a)** Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15 min); 25  $\mu\text{L}$  de AP-Cp 1  $\mu\text{g}$  en BSA 2% (30 min); 1-naftilfosfato (8 min). **b)** Influencia del tiempo de hidrólisis: 3  $\mu\text{L}$  de Strept-MBs; 25  $\mu\text{L}$  de anti-Cp-biotin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15 min); 25  $\mu\text{L}$  AP-Cp 1  $\mu\text{g}$  en BSA 2% (30 min); 1-naftilfosfato 5 mM.

#### **5.1.3.4. Calibrado y características analíticas**

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente y empleando voltamperometría diferencial de impulsos como técnica de medida, se obtuvieron las curvas de calibrado para ceruloplasmina empleando ambos magnetoinmunosensores. Como puede observarse en la Figura 62, las curvas presentan el hábito típico de los inmunosensores basados en un formato tipo competitivo, observándose una disminución de la intensidad de corriente a medida que aumenta la concentración de ceruloplasmina [Tijssen, 1985].



**Figura 62.** Calibrados de ceruloplasmina empleando **(A)** anti-Cp/Prot A-MBs y **(B)** anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE.

En la tabla siguiente se recogen las características analíticas obtenidas para ambos inmunosensores.

*Tabla 24.- Características analíticas de los inmunosensores anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE y anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE para la determinación de ceruloplasmina.*

	anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE	anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE
Intervalo lineal, μg/mL	0.1 - 1000 $r = 0.995$	0.025 - 20 $r = 0.997$
$EC_{50}$ , μg/mL	$4.7 \pm 1.8$	$0.9 \pm 0.1$
Constante de Hill	$-0.40 \pm 0.06$	$-0.51 \pm 0.06$
Mínimo, μA	$0.94 \pm 0.09$	$0.054 \pm 0.05$
Máximo, μA	$2.84 \pm 0.07$	$1.28 \pm 0.03$
LD, μg/mL	0.04	0.018
S, punto en ausencia de Cp (n=8)	0.08	0.05
R	0.996	0.997

$$\text{Ecuación } y = \frac{i_{\text{máx}} - i_{\text{mín}}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^h} + i_{\text{mín}}$$

$$LD = \left( \frac{i_{\text{máx}} - i_{\text{mín}}}{i_{\text{máx}} - i_{\text{mín}} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

Las diferencias encontradas en las características analíticas obtenidas para ambos diseños de magnetoimmunosensores surgen, probablemente, de las diferencias en la inmovilización orientada o no orientada de los anticuerpos de captura. Como ya se ha señalado, el inmunosensor que emplea Prot A-MBs requiere una mayor cantidad de AP-Cp (5 μg/mL) para saturar las posiciones de unión al anti-Cp inmovilizado de forma orientada (2.5 μg/mL). Por lo tanto, la competición entre la Cp

analito y la AP-Cp es más desfavorable, dando así lugar a una curva de calibrado con un intervalo lineal con concentraciones superiores de Cp, así como a un límite de detección más alto. Por el contrario, es necesario una concentración de AP-Cp inferior ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) para saturar al anticuerpo biotinilado inmovilizado al azar sobre las Strept-MBs (a pesar de emplear una concentración de anticuerpo 4 veces superior) y, lógicamente, al ser inferior la concentración de AP-Cp empleada, es más fácil la competencia entre el analito y la AP-Cp, dando lugar a un intervalo lineal con concentraciones más bajas, un menor límite de detección y un menor valor de  $EC_{50}$ . Este último valor se corresponde con el punto de inflexión de la curva y es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la mitad de la máxima, es decir, cuando la competición entre la ceruloplasmina analito y la ceruloplasmina marcada por los sitios de unión del anticuerpo tiene lugar en un 50%. Puede decirse, por tanto, que cuanto menor es su valor, mayor es la afinidad del antígeno analito por el anticuerpo.

Cuando estos resultados se comparan con los reportados para el único inmunosensor descrito en la bibliografía hasta el momento, se aprecia que el extremo inferior del intervalo lineal del magnetoinmunosensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE es del orden de diez veces menor al del calibrado del inmunosensor desarrollado por Wang y col. ( $0.31$  y  $27.0 \mu\text{g/mL}$ ). Del mismo modo, el límite de detección obtenido es aproximadamente diez veces menor ( $0.15 \mu\text{g/mL}$ ) [Wang, 2004].

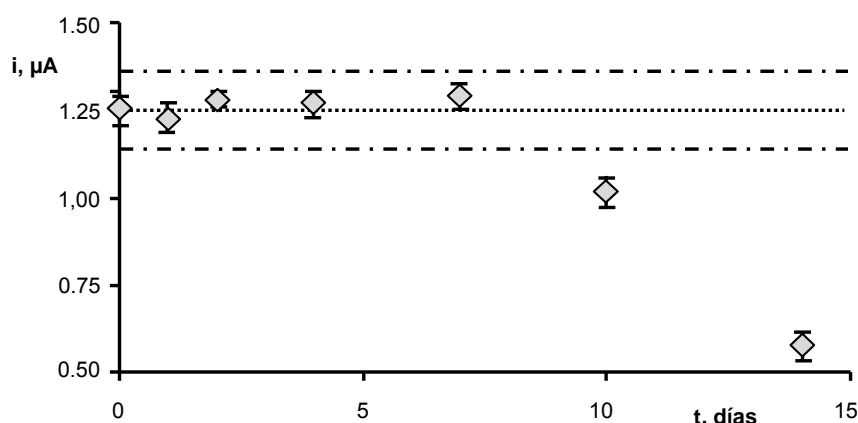
### ***Reproducibilidad y tiempo de vida***

Para llevar a cabo los estudios de reproducibilidad y estabilidad de las señales analíticas, se investigaron diferentes aspectos relacionados con estos parámetros. En primer lugar se evaluó la reproducibilidad de las medidas realizadas con ocho inmunosensores diferentes preparados simultáneamente con el mismo material durante un mismo día de trabajo. Estos estudios se realizaron en ausencia de ceruloplasmina y en presencia de una concentración de ceruloplasmina de  $6.0 \mu\text{g/mL}$  cuando se empleó el inmunosensor anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE y de  $1.0 \mu\text{g/mL}$  para el inmunosensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE, valores muy próximos al punto  $EC_{50}$  en cada caso.

Los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos en estas condiciones fueron de 5.2 y 7.3% en ausencia y en presencia de ceruloplasmina, respectivamente, para medidas realizadas en el mismo día utilizando los inmunosensores anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE, y de 3.2 y 6.4% empleando los inmunosensores basados en partículas funcionalizadas con estreptavidina, anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE. Estos valores demuestran que el proceso de fabricación de los inmunosensores es fiable y que permite obtener respuestas reproducibles con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera.

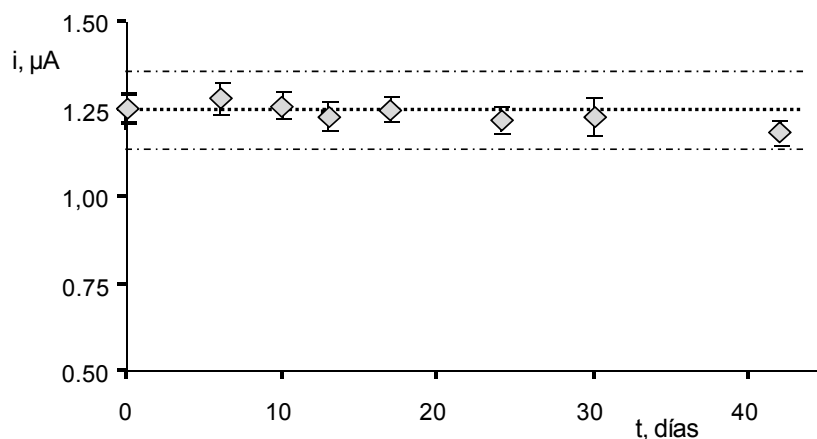
En segundo lugar, se evaluó la estabilidad de los conjugados anti-Cp/Prot A-MBs/SPCE y anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE. Para realizar este estudio, se prepararon varios tubos eppendorf conteniendo la misma cantidad de conjugado y se almacenaron en 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl a 4°C. Cada día se utilizaron tres conjugados para preparar el inmunosensor y medir la respuesta de corriente en ausencia de ceruloplasmina, empleando una disolución de AP-Cp 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-HCl ó 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en Tris-HCl conteniendo 2% de BSA, respectivamente para cada conjugado, habiéndose realizado un lavado previo con disolución reguladora Tris-HCl en ambos casos. En las Figura 62 se han representado los gráficos de control en los que se han señalado los márgenes de  $\pm 3s$  correspondientes a la medida de la respuesta del inmunosensor el primer día de trabajo.

Como puede observarse, las señales obtenidas utilizando conjugados anti-Cp-biotin/Strept-MBs decaen después del séptimo día, lo que puede atribuirse a la aglutinación de las partículas magnéticas, hecho que podía observarse a simple vista.



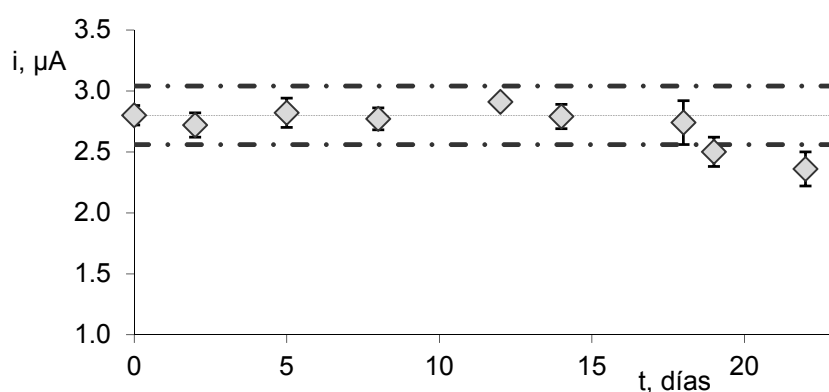
**Figura 62.** Estabilidad de anti-Cp-biotin/Strept-MBs en Tris-HCl almacenado a 4°C. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de ceruloplasmina.

Para evitar este fenómeno se decidió adicionar un agente dispersante, Tween 20, a la disolución de almacenamiento y repetir el estudio. Los resultados se muestran en la Figura 63 donde puede apreciarse como la respuesta de los inmunosensores se mantuvo dentro del intervalo del gráfico de control durante al menos 42 días.



**Figura 63.** Estabilidad de anti-Cp-biotin/Strept-MBs en PBST almacenado a 4°C. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de ceruloplasmina.

Las medidas obtenidas en las condiciones anteriores de almacenamiento, para los conjugados de anti-Cp/Prot A-MBs se mantienen dentro de los límites de control durante 18 días (Figura 64).

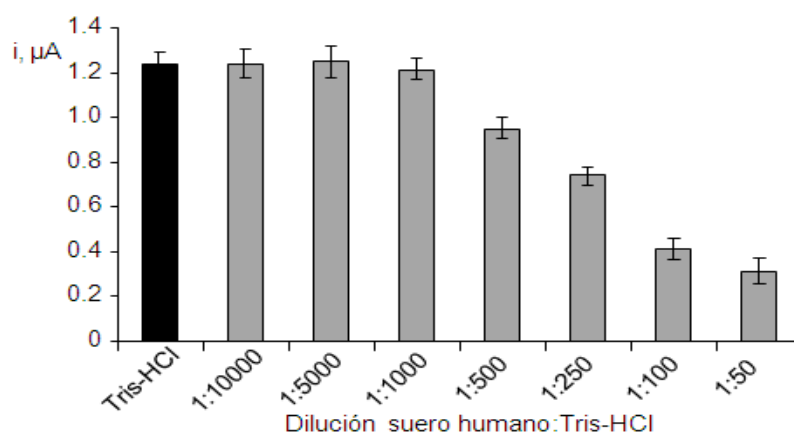


**Figura 64.** Estabilidad de anti-Cp/Prot A en PBST almacenado a 4°C. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de ceruloplasmina.

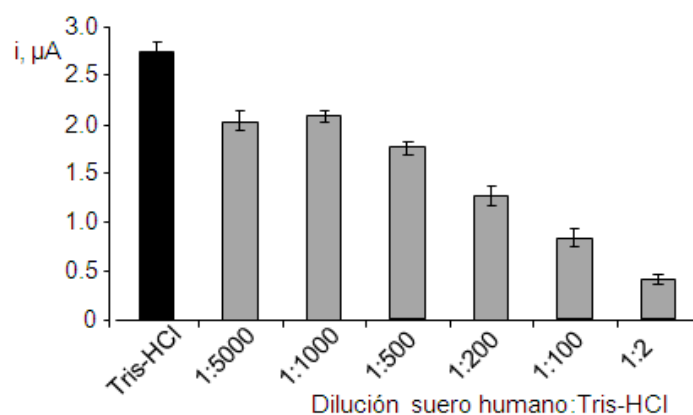
Esta característica tiene una gran importancia desde el punto de vista práctico, ya que una vez preparados los inmunosensores pueden almacenarse en condiciones adecuadas, empleándolos posteriormente, cuando se precise, para la construcción y uso inmediato del inmunosensor.

### 5.1.3.5. Selectividad de los magnetoinmosensores

Para evaluar la selectividad, en primer lugar se estudió que dilución de suero debía emplearse para que no existiera efecto matriz. En las Figuras 65 y 66 se muestra la respuesta de los magnetoinmosensores en muestras de suero que no contienen ceruloplasmina y que fueron diluidas con diferentes proporciones de regulador Tris-HCl. Como puede observarse, existe un fuerte efecto matriz para las diluciones más pequeñas de la muestra de suero. Sin embargo, este efecto desaparece cuando se efectúan diluciones superiores a 1000 para el inmunosensor que utiliza partículas magnética funcionalizadas con estreptavidina (Figura 65). Sin embargo, en la Figura 66 se observa como ninguna de las diluciones ensayadas fue suficiente para eliminar el efecto matriz en el caso del inmunosensor que emplea partículas modificadas con proteína A y, que incluso para una dilución 1/5000 del suero, tiene lugar un importante descenso en la intensidad de corriente respecto de la señal obtenida en el medio regulador.



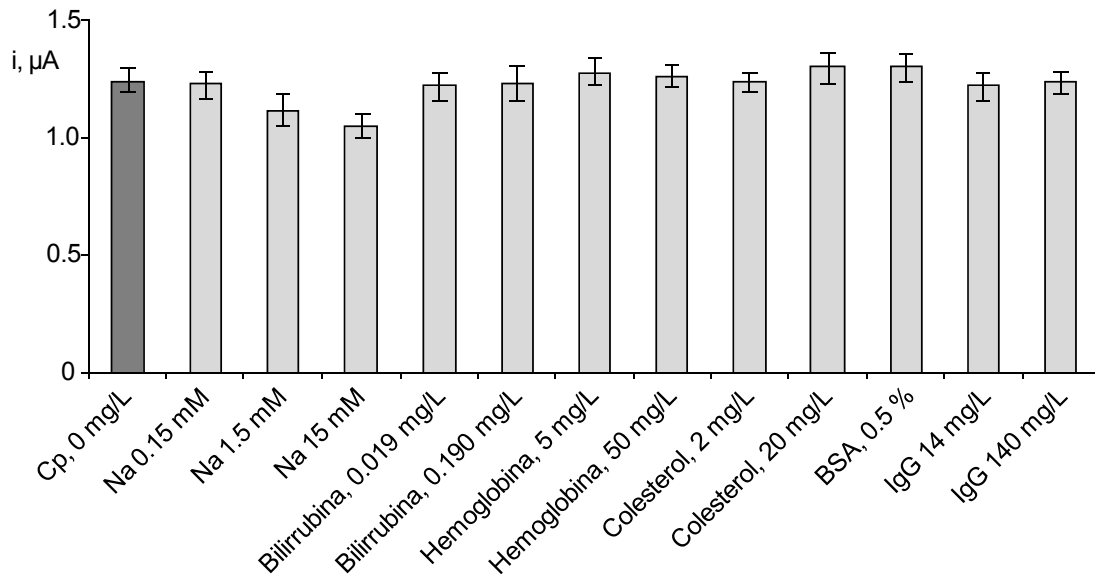
**Figura 65.** Estudio de la influencia de la dilución de suero en la respuesta voltamperométrica del inmunosensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs.



**Figura 66.** Estudio de la influencia de la dilución de suero en la respuesta voltamperométrica del inmunosensor anti-Cp/Prot A-MBs.

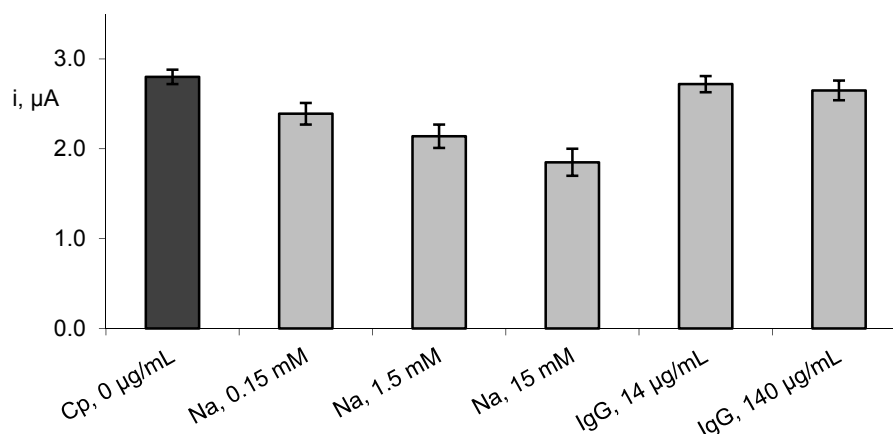
Estas diferencias pueden atribuirse a la mayor selectividad de la unión biotina-estreptavidina que previene de forma más eficaz la interacción con otras proteínas presentes en el suero. Por este motivo, solo el conjugado anti-Cp-biotin/Strept-MBs fue empleado para el análisis de muestras de suero.

Para profundizar en las causas de la disminución de la señal obtenida empleando el inmunosensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs para bajas diluciones de suero, se registró la señal analítica en presencia de otros compuestos como bilirrubina (19 y 190 ng/mL), hemoglobina (5 y 50 µg/mL), colesterol (2 y 20 µg/mL), BSA (0.5%) e inmunoglobulina G de suero humano (IgG, 19 y 190 µg/mL), los cuales pueden estar presentes en muestras de suero y otras muestras biológicas de interés junto a la ceruloplasmina (Figura 67). Los niveles indicados entre paréntesis son los habituales en las muestras de suero en dilución 1/1000 y 1/100 respectivamente, excepto en el caso del BSA que son los niveles correspondientes a una dilución 1/10 del suero. Además, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial suministradora de ceruloplasmina, se evaluó el efecto de la presencia del ion sodio. Como puede observarse, las señales en presencia de todas las proteínas y del colesterol son similares a la correspondiente a una disolución blanco, que no contiene ceruloplasmina, lo que pone de manifiesto la excelente selectividad de la determinación de ceruloplasmina en fluidos biológicos. En cuanto a la influencia de la presencia de ion sodio sobre la señal del inmunosensor, se ensayaron concentraciones de 0.15, 1.5 y 15 mM, correspondientes a la concentración de este ion en las muestras de suero diluidas 1/1000, 1/100 y 1/10, respectivamente, observándose un descenso en la corriente de pico a medida que aumenta la concentración de sodio. No obstante, la disminución de señal observada inferiores a 1/500 (Figura 65) no puede ser atribuida a la posible presencia de este ion en la muestra.



**Figura 67.** Estudio de reactividad cruzada con sodio, bilirrubina, hemoglobina, colesterol, BSA e inmunoglobulina de suero humano en ausencia de ceruloplasmina para el conjugado anti-Cp-biotin/Strept-MBs

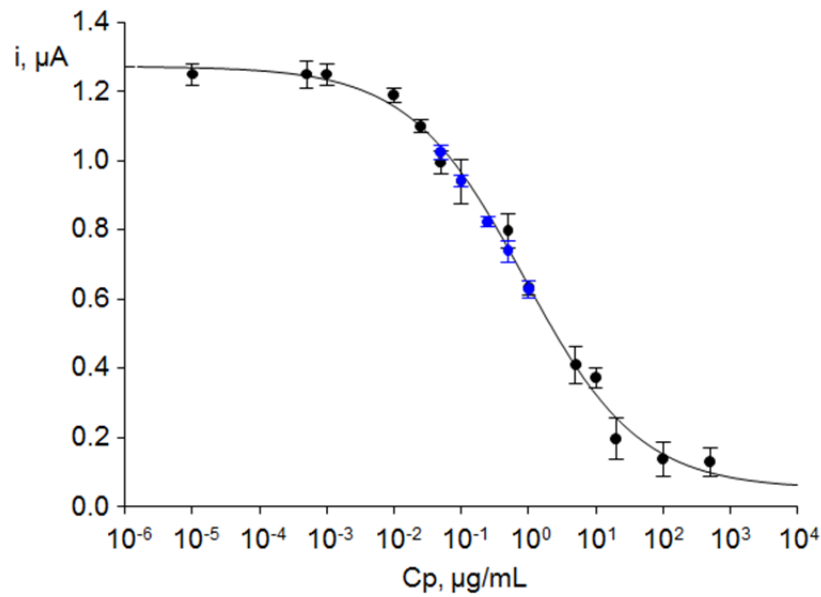
En el caso del magnetoinmosensores basado en el empleo de partículas magnéticas modificadas con proteína A, se estudió la influencia de la presencia de inmunoglobulina G humana sobre la señal analítica, con el fin de evaluar la posibilidad de que las inmunoglobulinas presentes en la muestra de suero produzcan el desplazamiento del anticuerpo de captura y, fuera ésta la causa del fuerte efecto matriz observado para bajas diluciones del suero. Como puede observarse en la Figura 68, la presencia de IgG a los niveles de concentración presentes en una dilución de suero 1/1000 y 1/100 no produce una disminución significativa de la señal obtenida. También se estudió el efecto de la presencia de sodio a niveles de concentración correspondientes a diluciones de suero 1/1000, 1/100 y 1/10. Aunque el ion sodio da lugar a una mayor disminución de la señal, no se puede atribuir a su presencia el elevado efecto matriz, por lo que dicho efecto ha de deberse a la conjunción de varios factores que afectan a la señal obtenida con el inmosensores.



**Figura 68.** Estudio de reactividad cruzada con inmunoglobulina de suero humano en ausencia de ceruloplasmina para el conjugado anti-Cp/Prot A-MBs.

#### 5.1.3.6. Aplicación del inmunosensor AP-Cp+Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE a la determinación de ceruloplasmina en una muestra de suero enriquecida

Para demostrar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado al análisis de muestras reales de interés clínico, se puso a punto un método de determinación de Cp en suero enriquecido. Se empleó un tipo de suero humano deficiente en progesterona, presente en forma liofilizada, que se conservó a 4°C. De forma previa al análisis, el suero se reconstituyó con 1 mL de Tris-HCl de pH 7.2, mezclando mediante agitación suave hasta su total disolución. Con el fin de confirmar la ausencia de efecto matriz, se prepararon disoluciones de suero enriquecido a diferentes niveles de concentración (1000, 500, 250, 100 y 50 μg/mL de Cp). Posteriormente se llevó a cabo una dilución 1:500 con Tris-HCl y finalmente una dilución 1:1 con AP-Cp de 2.0 μg/mL en el mismo medio regulador. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 69 (puntos azules). Con fines comparativos, se han superpuesto en color negro los puntos correspondientes al calibrado obtenido para disoluciones patrón de Cp. Como puede observarse, la respuesta voltamperométrica correspondiente a la muestra reconstituida es muy similar a las medidas obtenidas con disoluciones patrón de ceruloplasmina de igual concentración, siendo las pendientes de los tramos lineales de  $(-0.30 \pm 0.2)$  y  $(-0.30 \pm 0.1)$  μA, respectivamente. Este resultado significa que la determinación de Cp en el suero puede llevarse a cabo por interpolación directa en el calibrado de patrones.



**Figura 69.** Superposición de las señales obtenidas para la muestra en el calibrado de patrones.

Los resultados obtenidos en el análisis de la muestra de suero humano enriquecido con ceruloplasmina a cinco niveles de concentración se resumen en la Tabla 25. Como puede observarse, los porcentajes de recuperación, entre 91 y 104%, ponen de manifiesto la utilidad del magnetoinmuno sensor desarrollado para la determinación de ceruloplasmina en muestras de suero, sin necesidad de aplicar ningún tipo de tratamiento de muestra, salvo la dilución.

*Tabla 25.- Determinación de ceruloplasmina en suero humano enriquecido mediante el magnetoinmuno sensor anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE.*

Cp, µg/mL	Cp encontrada, µg/mL	Recuperación, %
0.05	0.050 ± 0.003	101 ± 5
0.10	0.094 ± 0.006	94 ± 6
0.25	0.23 ± 0.02	94 ± 7
0.50	0.45 ± 0.04	91 ± 8
1.00	1.04 ± 0.07	104 ± 7

Es importante señalar la elevada sensibilidad del método puesto a punto en este trabajo, ya que permite la determinación de ceruloplasmina en suero a los niveles de concentración de interés en muestras biológicas a pesar de la dilución 1/1000 de la muestra.

### **5.1.3.7. Conclusiones**

Como conclusiones a esta parte se puede decir que se ha desarrollado por primera vez un inmunosensor electroquímico para la determinación de ceruloplasmina.

Se han desarrollado dos configuraciones de magnetoinmunosensores y se han comparado sus características analíticas en términos de intervalos de linealidad, límites de detección y precisión. Ambas configuraciones presentan características analíticas comparables o mejores, y un tiempo de análisis mucho más corto que los requeridos para diferentes kits de inmunoensayo comerciales.

Es importante remarcar que la estabilidad de almacenamiento del bioconjugado anti-Cp-biotina/Strept-MBs permite realizar la determinación de ceruloplasmina en aproximadamente 35 min, que es un tiempo de ensayo mucho más corto que la reportada para diferentes kits de inmunoensayo comerciales.

Es de destacar que en la configuración basada en el empleo de partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, es posible evitar el efecto matriz simplemente mediante una dilución adecuada de la muestra de suero en la disolución reguladora. Aunque la necesidad de realizar una dilución de la muestra incrementa el límite de detección con respecto al calculado en el medio regulador, la elevada sensibilidad del magnetoinmunosensor permite llevar a cabo el análisis de ceruloplasmina en muestras de interés clínico.

**5.2. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO  
BASADO EN LA MODIFICACIÓN DE LA  
SUPERFICIE ELECTRÓDICA POR GRAFTING**

---

---



### 5.2.1. Inmunosensor para estradiol

El estradiol es una hormona esteroidea derivada del colesterol, cuyos niveles normales en suero y orina son del orden de los pg/mL. Niveles por debajo de lo normal pueden relacionarse con una rápida pérdida de peso o grasa corporal baja. Asimismo, se ha observado que las personas con obesidad importante presentan un incremento en la producción de estrógenos, con aumento en la concentración plasmática de estradiol y estrona.

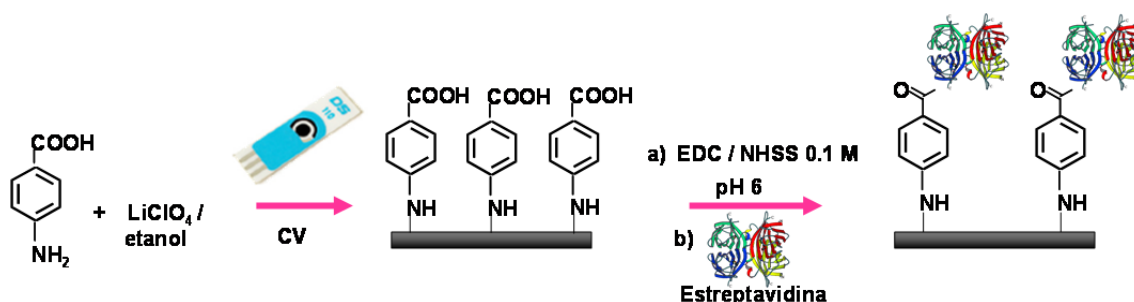
Debe destacarse el hecho de que la detección de moléculas de bajo peso molecular, como el estradiol, mediante el empleo de inmunosensores, presenta varias dificultades, entre las cuales se encuentra la imposibilidad del uso de configuraciones de inmunoensayo tipo sándwich. Esto hace que sea preciso establecer esquemas de tipo competitivo directo de menor sensibilidad. Teniendo esto en cuenta, el objetivo de este trabajo fue la preparación de un inmunosensor electroquímico para estradiol utilizando plataformas electrónicas modificadas con ácido *p*-aminobenzoico mediante la técnica del “grafting electroquímico” lo que permite la inmovilización covalente de estreptavidina seguida de la del anticuerpo biotinilado.

Esta estrategia ha hecho posible el diseño de un inmunosensor para estradiol con buenas características analíticas, destacando la alta sensibilidad, la estabilidad de almacenamiento y la rapidez de respuesta. Asimismo, se ha demostrado su aplicabilidad para la determinación de estradiol en muestras de interés clínico como suero y orina.

### 5.2.1.1. Configuración del inmunosensor

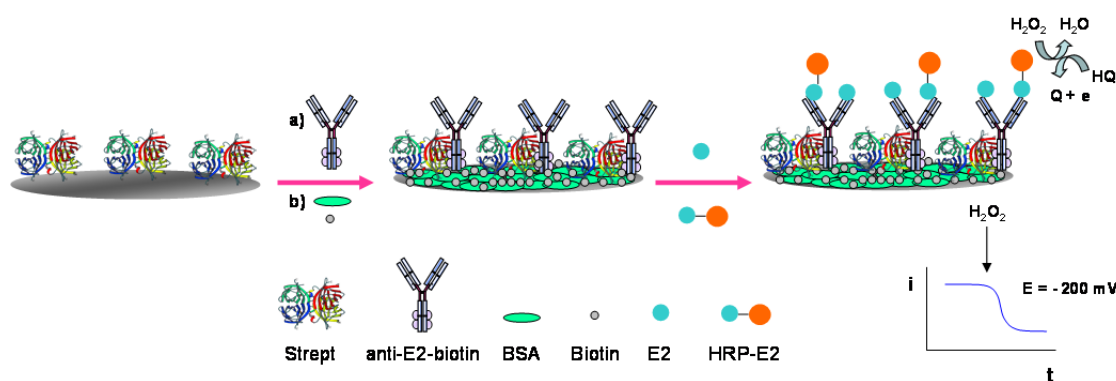
Indudablemente, uno de los aspectos más importantes en el diseño de inmunosensores electroquímicos es la elección del método de inmovilización de las biomoléculas, que debe asegurar que éstas mantengan su actividad biológica. Entre la gran variedad de estrategias descritas en la bibliografía, la unión covalente de las biomoléculas a superficies activadas químicamente resulta ser una alternativa interesante a los métodos físicos para mejorar la sensibilidad y estabilidad de los inmunosensores electroquímicos [Hayat, 2011; Huy, 2011].

Así, para la determinación de estradiol, se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico basado en un formato tipo competitivo directo y en el empleo de SPCEs modificados con la técnica de *grafting* por formación de enlaces covalentes a través de grupos carboxilo generados por funcionalización de la superficie electródica con radicales amino del *p*ABA, según un protocolo adaptado de [Liu, 2000] y activados posteriormente con EDC y NHSS para inmovilizar estreptavidina sobre el electrodo (Figura 70).



**Figura 70.** Esquema del procedimiento seguido para la inmovilización de estreptavidina sobre el SPCE: Strept/*p*ABA/SPCE.

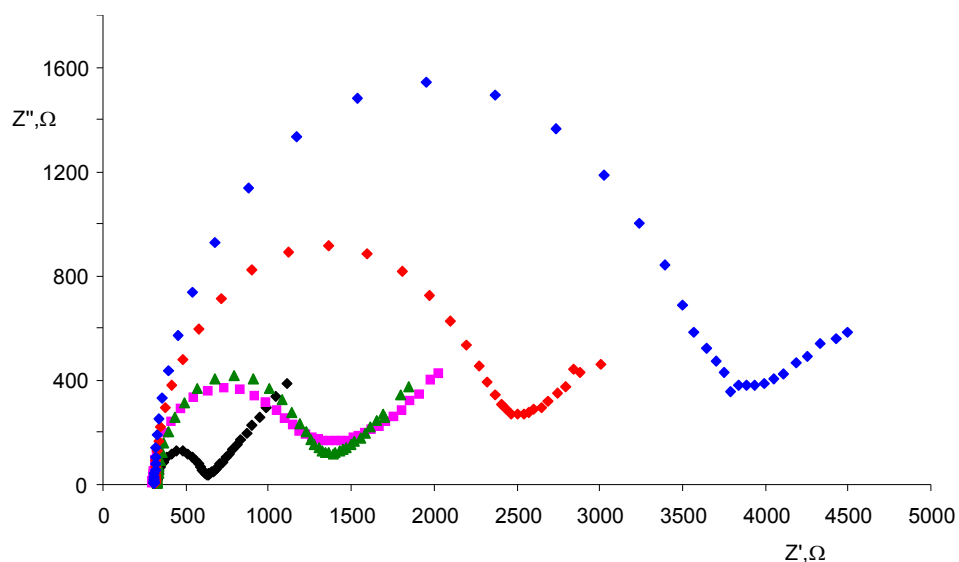
Tras la modificación de la superficie con estreptavidina, se inmoviliza covalentemente el anticuerpo biotinilado específico frente a estradiol (anti-E2-biotin). La cuantificación se lleva a cabo mediante el ensayo de tipo competitivo entre el estradiol presente en la muestra y estradiol marcado con la enzima peroxidasa (HRP-E2), estableciéndose la competición entre estas dos especies por los sitios de unión al anticuerpo biotinilado inmovilizado. La detección electroquímica se realiza empleando HQ como mediador redox y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la enzima peroxidasa (Figura 71).



**Figura 71.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE.

### 5.3 1.2. Caracterización de la superficie electródica

Las etapas de modificación de la superficie electródica con ácido *p*-aminobenzoico, de activación de los grupos carboxílicos con EDC/NHSS y de inmovilización de la estreptavidina, así como la de unión del anticuerpo biotinilado, se han monitorizado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica. En la Figura 72 se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos. Como puede observarse, la modificación del SPCE con *p*A BA da lugar a un incremento en la resistencia a la transferencia de carga,  $R_{ct}$ , de 279 a 907  $\Omega$  como consecuencia de la repulsión electrostática entre la sonda redox presente en la disolución (ferro y ferricianuro) y los grupos carboxilato de la superficie electródica. La activación con EDC/NHSS no da lugar a un cambio significativo de la  $R_{ct}$  (968  $\Omega$ ) dada la pequeña variación en el tamaño y el peso molecular del producto de reacción y la carga negativa del grupo sulfonato. Como era de esperar, las siguientes etapas correspondientes a la inmovilización de estreptavidina y del anticuerpo biotinilado dan lugar a aumentos drásticos de la  $R_{ct}$  (2127 y 3772  $\Omega$  respectivamente), como consecuencia de la barrera aislante que proporciona la inmovilización de proteínas sobre la superficie electródica.



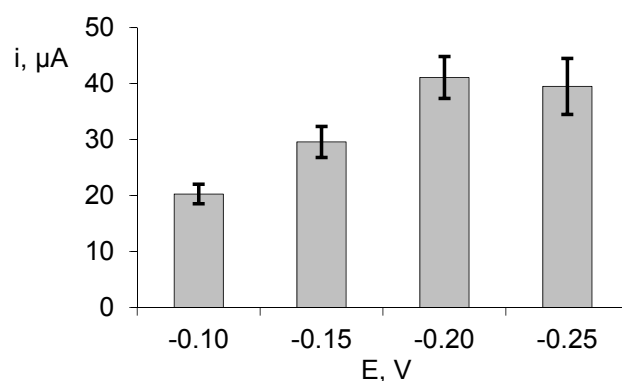
**Figura 72.** Diagramas de Nyquist registrados en disolución  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM en medio KCl 0.1 M del SPCE sin modificar (◆); pABA/SPCE (▲); pABA/SPCE activado con EDC/NHSS (▲), Strept/pABA/SPCE (▲); anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE (▲)

### 5.2.1.3. Optimización de las variables experimentales

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad en la determinación de estradiol, se ha seleccionado el potencial de detección y el pH de la disolución de medida. Asimismo, se han optimizado todas las etapas implicadas en la preparación del inmunosensor y en la realización del inmunoensayo.

#### ***Influencia del potencial de detección empleando hidroquinona como mediador***

El estudio del potencial de detección se realizó mediante medidas amperométricas en disoluciones agitadas en el intervalo de -0.10 a -0.25 V. Como puede apreciarse, en la Figura 73 la magnitud de la corriente de reducción de la quinona aumenta rápidamente hasta -0.20 V, permaneciendo prácticamente constante para potenciales más negativos. Con objeto de conseguir una detección sensible y precisa, así como de minimizar el número de interferentes potenciales capaces de ser reducidos en la superficie del electrodo, se seleccionó un potencial de trabajo de -0.20 V para estudios posteriores.



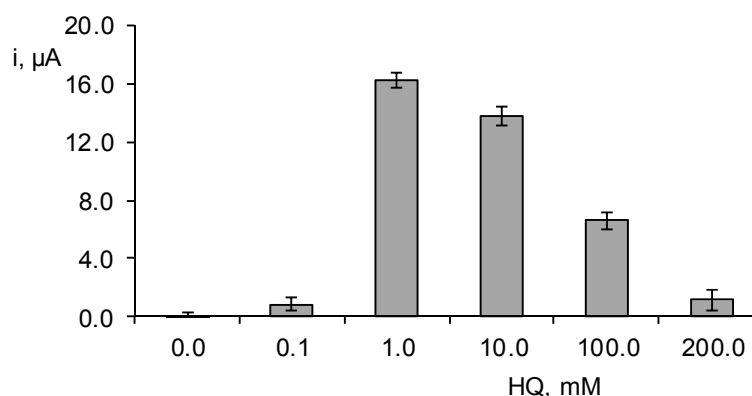
**Figura 73.** Estudio de la influencia de potencial de medida sobre la señal de SPCE modificado con HRP-E2 (dilución 1:100) en medio PBS pH 6.0 en presencia de 50 mM de  $H_2O_2$  y empleando HQ como mediador

#### ***Influencia del pH de medida***

Para seleccionar el pH de medida, se registraron las señales amperométricas en el intervalo comprendido entre 5.5 y 7.5, obteniéndose señales prácticamente constantes en el intervalo estudiado. Sin embargo, se observó un decrecimiento con el tiempo de las medidas realizadas a pH superiores a 6.0, que se atribuye a la menor estabilidad de la hidroquinona a valores más altos de pH, por lo que se seleccionó un pH de medida de 6.0.

#### ***Influencia de la concentración de mediador y sustrato***

La influencia de la concentración de HQ se evaluó en el intervalo comprendido entre 0 y 200 mM, empleando una concentración 50 mM de  $H_2O_2$ . En la Figura 74 se observa que la máxima corriente se obtiene para una concentración de HQ igual a 1 mM.

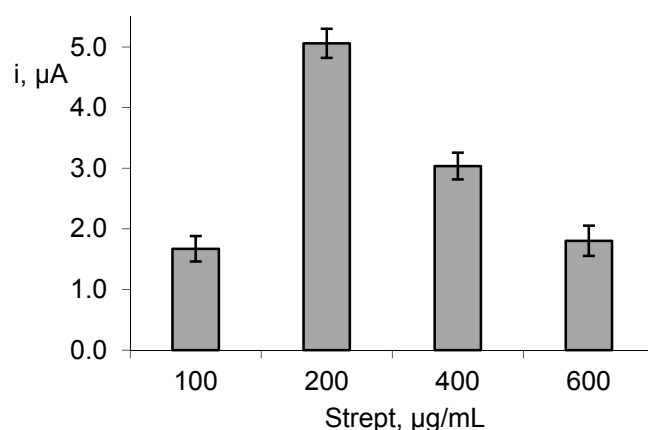


**Figura 74.** Estudio de la concentración de HQ sobre la señal de SPCE modificado con HRP-E2 (dilución 1:100) en medio PBS pH 6.0 en presencia de 50 mM de  $H_2O_2$ .

Utilizando esta concentración de HQ óptima se estudió la influencia de la concentración del sustrato preparando inmunosensores en las mismas condiciones y registrando la señal de corriente cuando se adiciona peróxido de hidrógeno en concentraciones 1, 5, 50 y 500 mM. Los resultados obtenidos demostraron que una concentración de 50 mM de peróxido de hidrógeno es la que proporciona una mayor respuesta, por lo que se seleccionó este valor como óptimo para llevar a cabo la determinación de estradiol mediante el inmunosensor desarrollado.

### ***Influencia de la cantidad de estreptavidina***

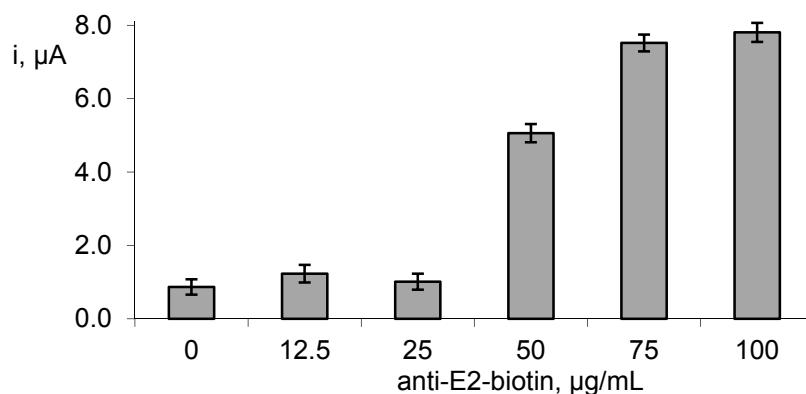
El efecto de la concentración de estreptavidina se estudió variando la cantidad de proteína inmovilizada sobre los electrodos serigrafados modificados con *p*ABA entre 0 y 600  $\mu\text{g/mL}$ . Los inmunosensores para este estudio se prepararon incubando durante 1 hora en una disolución de anti-estradiol biotinilado de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Seguidamente, para minimizar las adsorciones inespecíficas, se lleva a cabo el bloqueo de las posiciones reactivas del electrodo incubando en una mezcla que contiene biotina 3 mM y BSA 5% durante 40 minutos. A continuación se incubó en 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de estradiol-HRP 1:100 que contiene un 2% de BSA durante 45 minutos a 4°C. En la Figura 75 se muestra la influencia de la concentración de estreptavidina sobre la corriente de reducción de la benzoquinona generada en la reacción enzimática de la peroxidasa. A la vista de los resultados obtenidos, se eligió una concentración de estreptavidina de 200  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 75.** Influencia de la concentración de estreptavidina: 10  $\mu\text{L}$  de Strept; 10  $\mu\text{L}$  de anti-E2-biotin de 50  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 10  $\mu\text{L}$  de biotin 3mM/BSA 5% (40 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-E2 de dilución 1/1000 en BSA 2% (45 min a 8°C).

### ***Influencia de la cantidad de anti-estradiol biotinilado y tiempo de incubación***

Empleando las condiciones experimentales anteriores se optimizó la concentración de anti-estradiol biotinilado (anti-E2-biotin). Como puede observarse en la Figura 76, la intensidad de corriente aumenta hasta una concentración del anti-E2-biotin de 75  $\mu\text{g/mL}$ , manteniéndose prácticamente constante para concentraciones superiores a dicho valor.



**Figura 76.** Influencia de la concentración de anticuerpo. 10  $\mu\text{L}$  de Strept de 200  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de anti-E2-biotin (60 min); 10  $\mu\text{L}$  de biotin 3mM/BSA 5% (40 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-E2 de dilución 1/1000 en BSA 2% (45 min a 8°C).

En cuanto al tiempo de incubación en la disolución de anti-estradiol biotinilado, no se observan variaciones significativas entre 15 y 60 minutos, por tanto, se selecciona el menor tiempo, 15 minutos, para estudios posteriores.

### ***Optimizaciones del procedimiento de bloqueo***

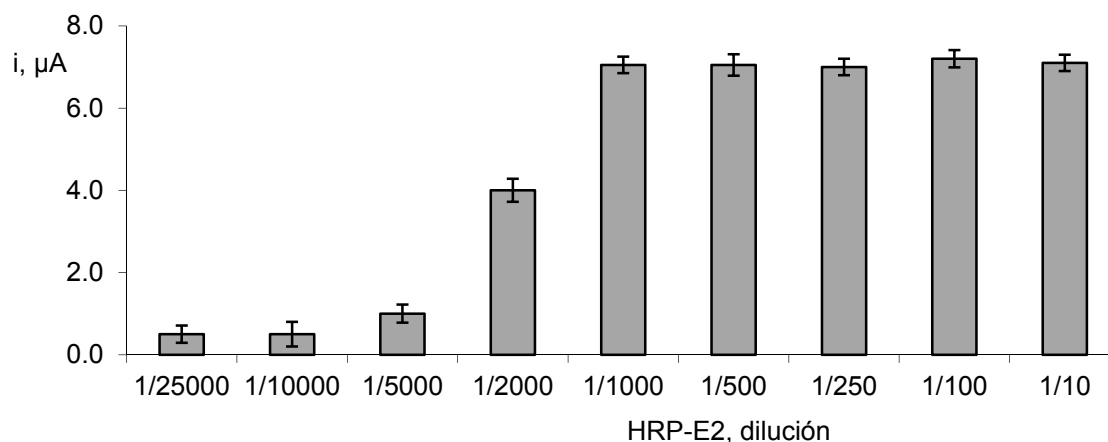
Se han realizado varios estudios encaminados a evitar en lo posible uniones inespecíficas del estradiol marcado con la enzima peroxidasa sobre la superficie del electrodo. Como se ha comentado en la Parte Experimental, la disolución de HRP-E2 contiene un 2% de BSA. Además, es necesario introducir una etapa de bloqueo tras la inmovilización del anti-estradiol biotinilado. Esta etapa se optimiza depositando un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de una disolución que contiene biotina 2050 ó 3000  $\mu\text{M}$  en presencia de BSA al 2, 3, 4 ó 5% sobre el electrodo modificado anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE durante 40 minutos. Los resultados obtenidos demuestran que la disolución bloqueante que contiene biotina 3 mM + BSA 5% da lugar a una corriente debida a adsorciones inespecíficas extremadamente pequeña,

aproximadamente el 2.5% de la corriente correspondiente al HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE.

Asimismo, se comprueba que la corriente debida a adsorciones inespecíficas, empleando la disolución de bloqueo anterior y una disolución de estradiol-HRP en ausencia de BSA, se incrementó considerablemente (hasta un porcentaje del 50%). Este resultado demuestra la necesidad de incluir BSA en la disolución de estradiol-HRP.

### ***Influencia de la concentración del estradiol-HRP***

Para seleccionar la concentración de estradiol-HRP, se prepararon inmunosensores incubando a 8°C durante 1 h en disoluciones de la hormona marcada en el intervalo de dilución de 1:25000 a 1:10 en presencia de un 2% de BSA en medio regulador Tris 0.1 M de pH 7.2 que contiene MgCl<sub>2</sub> 1 mM. En la Figura 77 se observa un marcado aumento de la corriente a medida que aumenta la concentración de estradiol-HRP hasta una dilución de 1:1000, estabilizándose para concentraciones superiores, por lo que se ha seleccionado esta dilución para estudios posteriores.



**Figura 77.** Influencia de la concentración de Estradiol-HRP: 10  $\mu\text{L}$  de Strept de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de anti-E2-biotin de 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15 min); 10  $\mu\text{L}$  de biotin 3mM+BSA 5% (40 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-E2 en BSA 2% (45 min a 8°C).

### ***Influencia del tiempo de competición***

Además, se evaluó el tiempo de incubación necesario en una disolución que contiene la mezcla de estradiol y estradiol-HRP para que tenga lugar la competición entre ambos por los sitios de unión del anticuerpo. Para ello, se midió la respuesta de corriente de inmunosensores en ausencia y en presencia de 1 ng/mL de estradiol y variando el tiempo de incubación entre 0 y 60 minutos. Como se observa en la

siguiente tabla, la mayor diferencia de corriente para inmunosensores en presencia y ausencia de estradiol se obtuvo para un tiempo de 45 minutos.

*Tabla 26. Influencia del tiempo de competición*

t, min	Estradiol 0 µg/mL	Estradiol 1 µg/mL	Δi, µA
20	4.6 µA	0.39 µA	4.21
45	7.3 µA	0.51 µA	6.79
60	7.0 µA	0.55 µA	6.45

A modo de resumen, en la Tabla 27 se recogen las variables optimizadas, así como los intervalos de concentración o de tiempo de los diferentes estudios realizados y el valor elegido como óptimo en cada caso.

*Tabla 27. Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE.*

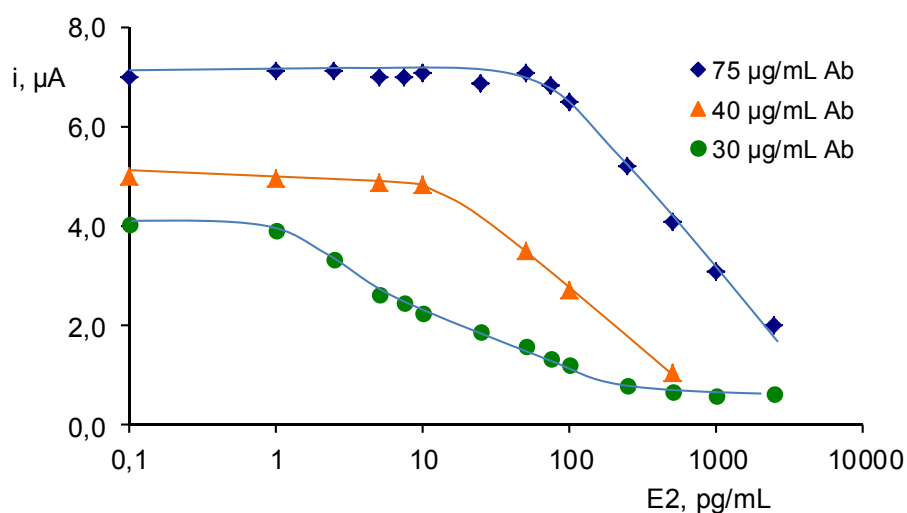
Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Strept, µg/mL	0 – 600	200
anti-E2-biotin, µg/mL	0 – 100	75
t <sub>inc</sub> anti-E2-biotin, min	0 – 60	15
HRP-E2, µg/mL	1/10 – 1/25000	1/1000
t <sub>competición</sub> , min	15 – 60	45
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , mM	1 – 500	50
HQ, mM	0 – 200	1
Potencial, V	-0.1 – -0.25	-0.2
pH medida	5.5 – 7.5	6

#### 5.2.1.4. Curvas de calibrado y características analíticas

En las condiciones experimentales optimizadas anteriormente, se construyó la curva de calibrado del estradiol y se calculó el límite de detección. El valor de LD obtenido en estas condiciones fue muy elevado (aproximadamente de 100 pg/mL), lo que puede ser debido a la alta concentración de anticuerpo empleada.

Es sabido que la concentración del anticuerpo de captura influye en la precisión, la sensibilidad y en el intervalo de concentración útil obtenido a partir de la curva de calibrado. Por esta razón, una vez optimizadas todas las variables

experimentales, se estudia la influencia de la concentración de anti-estradiol biotinilado preparando inmunosensores en presencia del analito estradiol. Para ello se inmoviliza anti-estradiol biotinilado de concentración variable, 30, 40 o 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se mide la respuesta correspondiente en presencia de concentraciones variables de estradiol. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la Figura 78, observándose un aumento marcado de la corriente conforme aumenta la concentración del anticuerpo biotinilado. Sin embargo, puede apreciarse que el intervalo dinámico es más amplio y la diferencia de corriente mayor para bajas concentraciones de estradiol cuando se emplea una menor concentración del anticuerpo biotinilado. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para otros biosensores que emplean un formato de ensayo competitivo [Ruth, 2001] y puede atribuirse a la mayor sensibilidad alcanzada cuando se emplea una concentración más baja de anticuerpo para las concentraciones más bajas de analito. Por tanto, como solución de compromiso entre una alta señal y la detección de bajas concentraciones de analito, se seleccionó una concentración de anticuerpo biotinilado de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la construcción de la curva de calibrado.

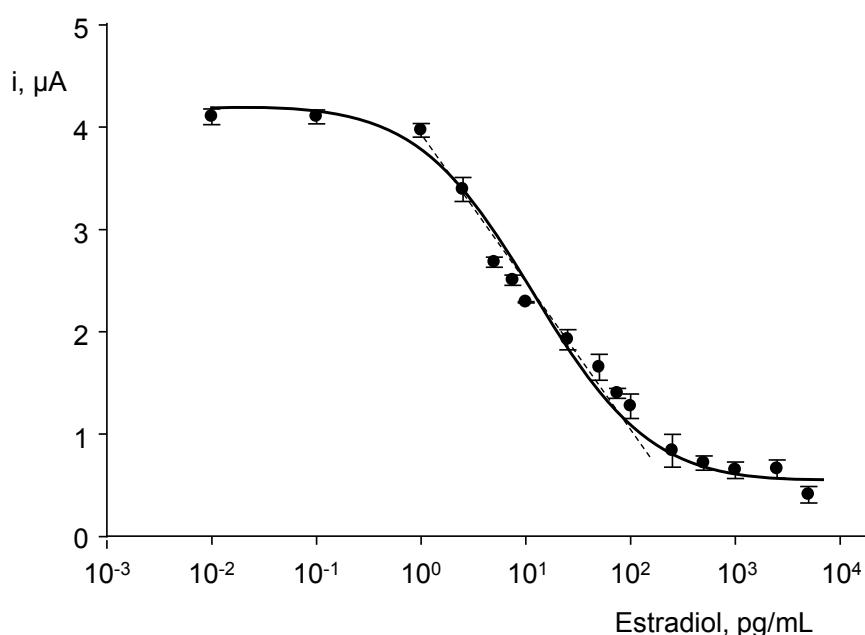


**Figura 78.** Calibrados obtenidos para una concentración de anticuerpo de 30, 40 y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Seguidamente, se obtuvo la curva de calibrado para estradiol en el intervalo de concentración comprendido entre  $10^{-2}$  y  $10^4$   $\text{pg}/\text{mL}$ , siendo el intervalo lineal de 1 a 250  $\text{pg}/\text{mL}$  ( $r=0.990$ ). Como puede observarse, la Figura 79 presenta la tendencia típica de un formato tipo competitivo, ajustándose a la ecuación paramétrica típica de los formatos competitivos ( $r = 0.994$ ) [Tijssen, 1985]:

$$y = \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{1 + \left( EC_{50}/x \right)^h} + i_{m\acute{i}n}$$

donde “ $i_{m\acute{a}x}$ ” e “ $i_{m\acute{i}n}$ ” son los valores de corriente máxima y mínima de la curva de calibrado. El  $EC_{50}$  que es la concentración de estradiol que proporciona una señal que es la mitad de la máxima (competición del 50%) fue de  $13 \pm 2$  pg/mL, y la pendiente de Hill,  $h$ , fue de  $-0.62 \pm 0.07$ .



**Figura 79.** Calibrado de estradiol obtenido con el inmunosensor HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE.

El límite de detección se calculó a partir de la ecuación [Conneely, 2007]:

$$LD = EC_{50} \left( \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

donde  $s$  ( $\pm 0.2$   $\mu$ A) es la desviación estándar de la corriente del punto cero obtenida para 8 medidas repetidas de inmunosensores preparados en ausencia de estradiol. El valor de LD obtenido fue de 0.77 pg/mL, considerablemente menor que el obtenido empleando una concentración de anti-estradiol biotinilado de 75  $\mu$ g/mL que fue aproximadamente de 100 pg/mL. El valor obtenido del LD es considerablemente más bajo que el reportado para otros inmunosensores encontrados en la bibliografía: 50 pg/mL [Pemberton, 2005], 18 y 26 pg/mL [Liu, 2010b], ó 15 pg/mL [Volpe, 2006], y

sólo ligeramente superior al obtenido por Butler, 0.25 pg/mL [Butler, 2006]. Además, la pendiente de la porción lineal de la curva de calibrado, expresada como intensidad de corriente por década de concentración de estradiol, es más elevada que las obtenidas para otras configuraciones, excepto la obtenida por Liu para un electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro y el anticuerpo anti-estradiol tiodado con proteína G [Liu, 2010b].

En la tabla siguiente se resumen las características analíticas obtenidas para el inmunosensor de estradiol.

*Tabla 28.- Características analíticas del inmunosensor HRP-E2+E2/anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE para la determinación de estradiol.*

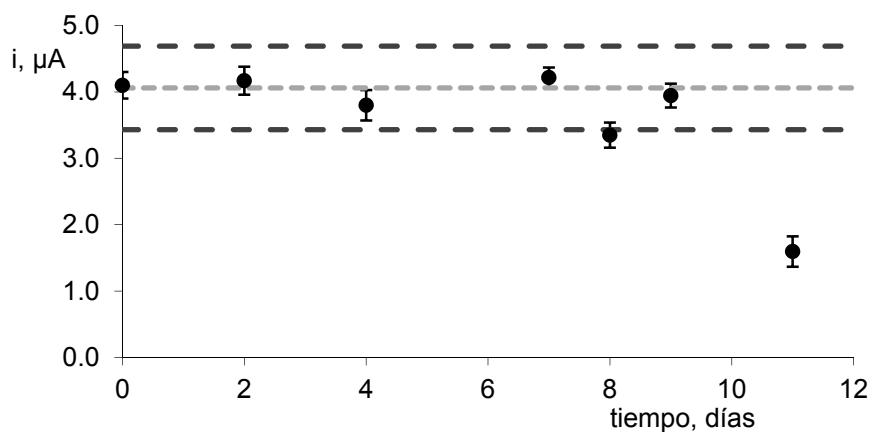
Ecuación	$y = \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{1 + (EC_{50}/x)^h} + i_{m\acute{i}n}$
Intervalo lineal, pg/mL	1 – 250 (r = 0.990)
EC <sub>50</sub> , pg/mL	13 ± 2
Constante de Hill	0.62 ± 0.07
Mínimo, µA	0.32 ± 0.11
Máximo, µA	4.25 ± 0.14
LD, pg/mL	1.006
s, punto en ausencia de estradiol, n=8	0.23
r	0.994

### **Reproducibilidad y tiempo de vida**

Los estudios de reproducibilidad de las medidas se realizaron midiendo la respuesta amperométrica de 8 inmunosensores diferentes, fabricados el mismo día, en ausencia de estradiol y en presencia de 12.5 pg/mL de estradiol. Los valores de RSD obtenidos fueron de 7.2 y 5.9 %, respectivamente. Asimismo reproducibilidad se evaluó también empleando cinco inmunosensores preparados en distintos días, siendo las desviaciones estándar relativas de 7.1 y 7.4 %, en ausencia y en presencia de la misma concentración de estradiol, respectivamente. Estos resultados demuestran la buena precisión de las medidas y ponen de manifiesto que el procedimiento de fabricación del inmunosensor es fiable y reproducible.

También se evaluó la estabilidad del electrodo modificado con el anticuerpo de captura. Para ello se prepararon diferentes electrodos modificados el mismo día y se almacenaron en nevera a 4°C en condiciones de humedad. Cada día se construyó el inmunosensor completo haciendo uso de los electrodos modificados anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE, y se midió la respuesta amperométrica en ausencia de estradiol.

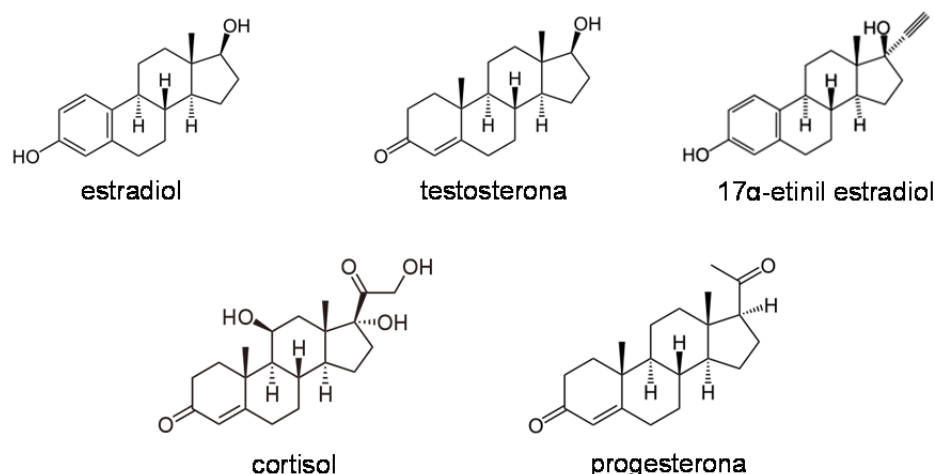
La Figura 80 muestra los resultados obtenidos durante un periodo de 11 días, representando cada punto la media de tres medidas sucesivas. Como puede observarse, la respuesta de los inmunosensores se mantuvo dentro de los límites de control, establecidos por  $\pm 3$  veces la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de trabajo ( $n=5$ ), durante un tiempo de 9 días.



**Figura 80.** Gráfico de control para anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de E2

#### 5.2.1.5. Selectividad del inmunosensor

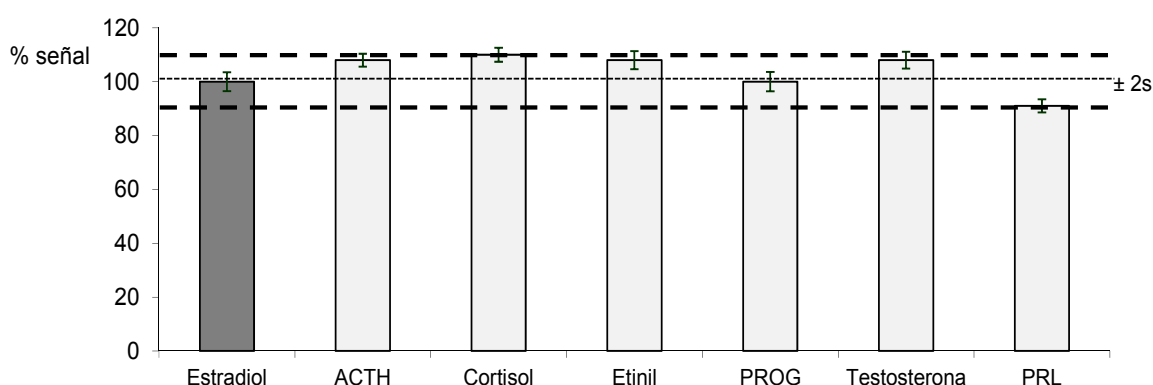
Para determinar la especificidad del inmunosensor, se ha estudiado el efecto de diferentes compuestos potencialmente interferentes relacionados estructuralmente con el estradiol (Figura 81) sobre la respuesta del inmunosensor (progesterona, testosterona, cortisol y 17 $\alpha$ -etinilestradiol), así como otras hormonas peptídicas (adrenocorticotropina y prolactina) que pueden estar presentes en muestras de suero junto al analito de interés.



**Figura 81.** Estructura de los compuestos: estradiol, testosterona, 17  $\alpha$ -etinilestradiol, cortisol y progesterona

La reactividad cruzada se calculó midiendo la corriente en ausencia de estradiol para inmunosenores anti-E2-biotin/Strept/*p*ABA/SPCE, en medio PBS 0.05 M de pH 6.0 en presencia de una concentración de 250 ng/mL de cada una de las hormonas, excepto en el caso del ACTH que es de 50 pg/mL. Estos valores corresponden a los niveles fisiológicos más elevados presentes en muestras de suero humano.

Como puede observarse en la Figura 82, todas las hormonas estudiadas presentan una señal similar a la que se obtiene en ausencia de estradiol, estando situadas en el intervalo  $\pm 2s$  de la intensidad media, donde *s* es la desviación estándar obtenida en ausencia de estradiol (primera barra).



**Figura 82.** Relación de la señal obtenida en presencia de cada uno de los interferentes entre la señal obtenida en ausencia de estradiol.

Aunque efectivamente la señal de todas las hormonas está incluida dentro de los límites del gráfico de control, la interferencia más seria provendría de la presencia de prolactina en la muestra de suero. Sin embargo, hay que señalar que la

concentración de prolactina empleada para este estudio es la presente en suero en situación de embarazo y en ese caso, la concentración de estradiol también aumenta considerablemente. El análisis de muestras de suero con un contenido tan alto de estradiol, del orden de los  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hace necesario la dilución de la muestra, lo que supondría una disminución de la concentración de prolactina en la muestra diluida y por tanto, la no interferencia de esta hormona en la señal de corriente del estradiol.

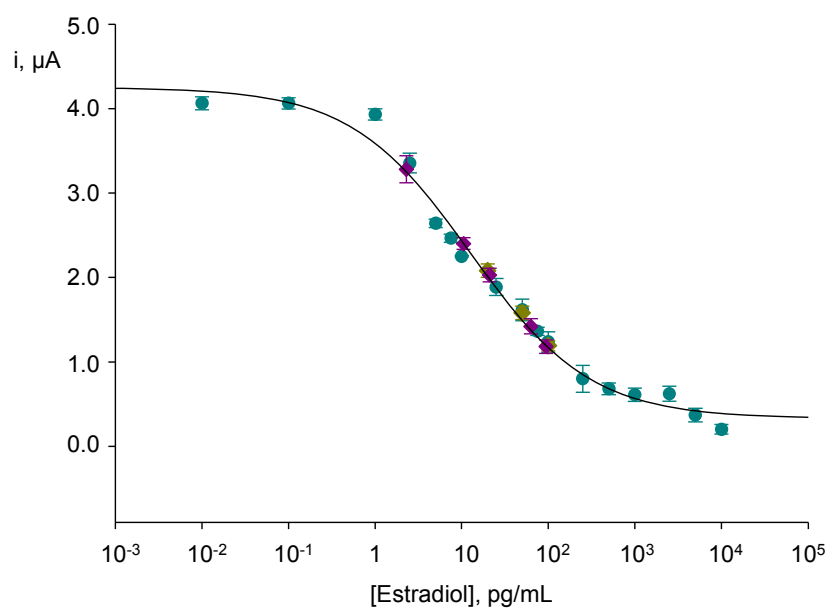
Estos resultados demuestran la alta selectividad del inmunosensor desarrollado y pone de manifiesto la elevada especificidad del anticuerpo del estradiol.

#### **5.2.1.6. Aplicación a la determinación de estradiol en suero y orina**

La utilidad del inmunosensor de estradiol desarrollado en este trabajo para el análisis de muestras reales se demostró analizando un suero certificado que contiene 188  $\text{pg}/\text{mL}$  de estradiol, así como muestras de orina contaminadas con estradiol a niveles de 20, 50 y 100  $\text{pg}/\text{mL}$ .

##### ***Suero humano certificado***

Primeramente, se evaluó la existencia del efecto matriz en la muestra de suero, para lo cual se construyó un calibrado de estradiol en suero empleando distintas diluciones de la muestra para obtener concentraciones de estradiol de 2.5, 10.5, 21.0, 63.0 y 94.0  $\text{pg}/\text{mL}$ . En la Figura 83, donde se ha representado de nuevo el calibrado de estradiol obtenido empleando disoluciones patrón, se han superpuesto los puntos correspondientes al calibrado construido en la matriz de suero. La pendiente de la porción lineal del calibrado fue de  $(-1.24 \pm 0.04) \mu\text{A}$ , no es estadísticamente diferente a la obtenida empleando disoluciones estándar de estradiol  $(-1.3 \pm 0.1) \mu\text{A}$ . Por lo tanto, no hay efecto matriz apreciable y fue posible determinar la concentración de estradiol mediante interpolación de la intensidad de corriente media en la curva de patrones. Las recuperaciones medias obtenidas están en el intervalo comprendido entre  $96 \pm 8 \%$  y  $102 \pm 2 \%$ .



**Figura 83.** Calibrados de estradiol obtenidos con disoluciones estándar (●), con disoluciones de muestras de suero de concentración variable de estradiol (●) y con disoluciones de muestras de orina enriquecidas en concentración variable de estradiol (●)

### **Orina**

El inmunosensor desarrollado también se aplicó al análisis de una muestra de orina enriquecida con concentraciones de estradiol de 20, 50 y 100  $\text{pg/mL}$ . En este caso, también es posible interpolar la señal obtenida para las muestras de orina en el calibrado de patrones, dada la similitud de la pendiente del calibrado de estradiol construido en la muestra de orina contaminada ( $-1.3 \pm 0.2$ )  $\mu\text{A}$  y la correspondiente al calibrado de patrones. Como puede observarse en la Tabla 29, las recuperaciones oscilan entre 95 y 100%.

Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad del inmunosensor desarrollado para el análisis de bajas concentraciones de estradiol en muestras de suero humano y orina sin necesidad de aplicar prácticamente ningún tratamiento a la muestra.

Empleando dicha estrategia, se analizaron las muestras de suero y orina con los resultados que se resumen en la Tabla 29.

Tabla 29. Concentración encontrada de estradiol y porcentaje de recuperación en muestras de suero y orina.

	Estradiol añadido, pg/mL	Estradiol encontrado, pg/mL	Recuperación, %
<b>Suero</b>	2.3	2.32 ± 0.05	100 ± 4
	10.5	10.5 ± 0.5	100 ± 4
	21	21 ± 2	99 ± 9
	63	64 ± 1	102 ± 2
	94	90 ± 8	96 ± 8
<b>Orina</b>	20	19 ± 3	95 ± 5
	50	50 ± 5	100 ± 10
	100	100 ± 6	100 ± 6

### 5.2.1.7. Conclusiones

EL inmunosensor electroquímico para estradiol se basa en la modificación superficial de un electrodo serigrafiado de carbono con ácido *p*-aminobenzoico seguido de unión covalente de estreptavidina e inmovilización de anti-estradiol biotinilado. Esta modificación permite la unión estable del anticuerpo a la superficie del electrodo.

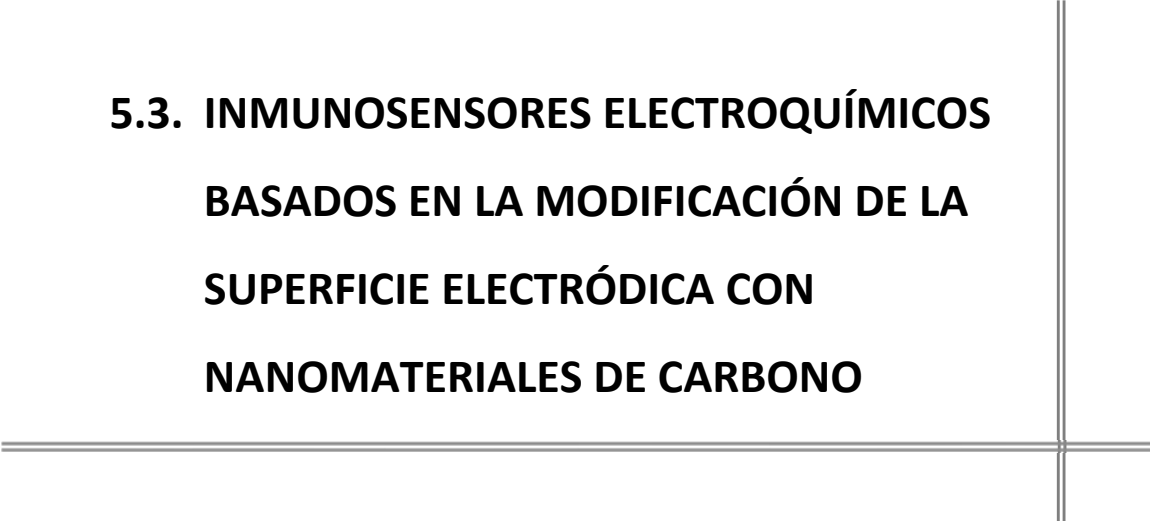
El intervalo lineal del calibrado, comprendido entre 1 y 250 pg/mL ( $r = 0.990$ ), es adecuado para la aplicación a muestras clínicas. Los estudios de reactividad cruzada con otras hormonas a niveles fisiológicos demostraron la práctica especificidad del anticuerpo y del método desarrollado. La reproducibilidad en la preparación de los inmunosensores es buena, %RSD = 5.9 ( $n=8$ ), y la estabilidad operativa de un único electrodo modificado con el inmunoconjugado anti-E2-biotin/Strept/pABA/SPCE es de nueve días, si se almacena entre medidas en condiciones de humedad en nevera a 4°C.

Finalmente, las buenas características analíticas obtenidas permiten su aplicación a la determinación de estradiol en muestras clínicas, como suero humano y orina, de forma rápida, sencilla y precisa.



**5.3. INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS  
BASADOS EN LA MODIFICACIÓN DE LA  
SUPERFICIE ELECTRÓDICA CON  
NANOMATERIALES DE CARBONO**

---





### **5.3.1. Inmunosensor para ceruloplasmina empleando nanotubos de carbono de pared múltiple**

El objetivo del desarrollo del inmunosensor electroquímico para la determinación de ceruloplasmina que se presenta a continuación surge de la necesidad de mejorar los sistemas de inmunoensayo basados en el empleo de partículas magnéticas, que no tienen sensibilidad suficiente para la determinación de esta proteína a bajas concentraciones, debido a la necesidad de llevar a cabo una dilución elevada de la muestra para eliminar el efecto matriz.

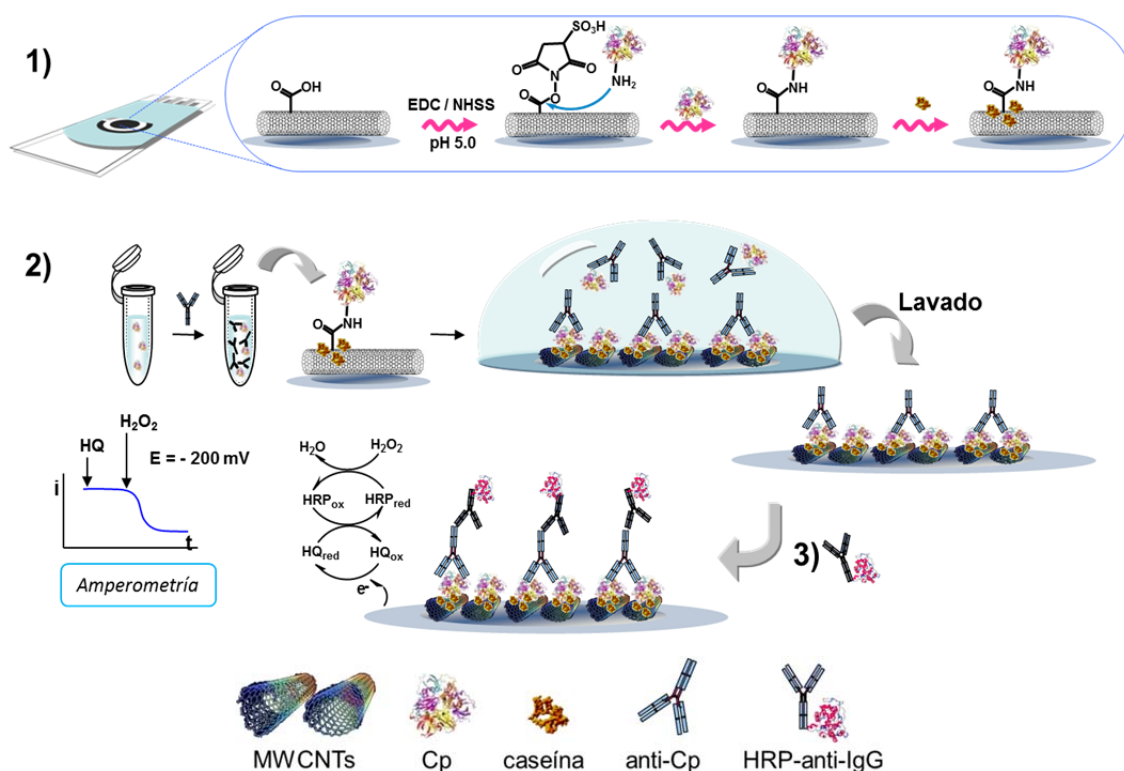
A continuación se describe un diseño basado en la inmovilización covalente de Cp a los grupos carboxilo presentes en la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) modificado con nanotubos de carbono oxidados. Se establece un esquema de inmunoensayo competitivo indirecto, en el que el antígeno (Cp analito) presente en la muestra compite con la Cp inmovilizada por los puntos de unión con el anticuerpo anti-Cp. Es de destacar que la reacción entre el anticuerpo y la ceruloplasmina presente en la muestra tiene lugar fuera de la superficie sobre la que se construye el inmunosensor y así se consigue minimizar posibles interferencias de la matriz en la señal electroquímica.

Otra ventaja que ofrece esta configuración va asociada al empleo de una superficie electródica modificada con nanotubos de carbono ya que este nanomaterial posee elevada conductividad y resistencia mecánica, así como la capacidad para mejorar la reacción de transferencia electrónica, aumentando la velocidad del proceso y disminuyendo el tiempo de respuesta.

Como se verá más adelante, este inmunosensor presenta características analíticas similares a las obtenidas con los magnetoinmunosensores anteriormente descritos. Sin embargo, presenta una ventaja muy importante, la inexistencia de efecto matriz en las muestras de suero y orina, evitando la necesidad de realizar una dilución previa de la muestra, lo que redundará en una mayor sensibilidad. Este hecho permite la determinación rápida y fiable de bajas concentraciones de ceruloplasmina en este tipo de muestras.

### 5.3.1.1. Configuración del inmunosensor

Se ha puesto a punto un inmunosensor amperométrico integrado para la determinación de ceruloplasmina en muestras de suero y orina. El inmunosensor emplea electrodos serigraviados de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (MWCNTs) sobre los que se inmoviliza ceruloplasmina covalentemente (Figura 834 1). La cuantificación se logra mediante un ensayo de tipo competitivo indirecto entre la ceruloplasmina inmovilizada y la ceruloplasmina libre presente en la disolución por los sitios de reconocimiento del anticuerpo (Figura 84 2). La monitorización de la reacción de afinidad Ag-Ab se lleva a cabo empleado un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, HRP-anti-IgG, empleando HQ como mediador redox y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato enzimático para la detección amperométrica a  $-200\text{ mV}$  (Figura 84 3). Evidentemente, cuanto mayor sea la concentración de antígeno en la muestra, menor será la de HRP-anti-IgG unido al anticuerpo anti-Cp, y menor será la respuesta electroquímica.



**Figura 84.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNTs-SPCE.

### 5.3.1.2. Optimización de las variables experimentales

Con el fin de obtener los mejores resultados se optimizaron las variables experimentales implicadas en la preparación y funcionamiento del inmunosensor. En la Tabla 30 se encuentran las variables optimizadas junto con los intervalos estudiados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

*Tabla 30.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE para la determinación de ceruloplasmina.*

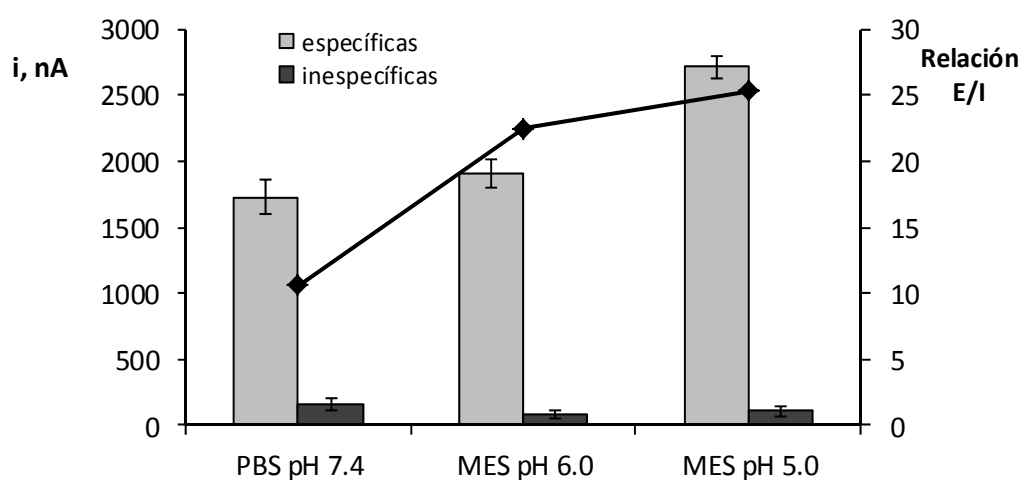
Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
pH <sub>inmovilización</sub> Cp	5.0, 6.0, 7.4	5.0
Cp, µg/mL	20 – 50	30
anti-Cp, µg/mL	0.75 – 10	2.5
t <sub>incubación</sub> Ag+Ab, min	10 – 45	20
T <sub>incubación</sub> Ag+Ab, °C	4, 25, 37	4
t <sub>competición</sub> , min	15 – 60	30
HRP-anti-IgG, dilución	1/200 – 1/750	1/750
t <sub>incubación</sub> HRP-anti-IgG, min	15 – 60	30

#### ***Influencia del medio de inmovilización y la cantidad de Cp inmovilizada***

En primer lugar, se eligió el mejor medio para llevar a cabo la inmovilización covalente de ceruloplasmina sobre la superficie del electrodo modificada con nanotubos carboxilados. Para ello se prepararon las disoluciones de Cp y la mezcla EDC/NHSS (para la activación de los nanotubos carboxilados sobre la superficie del electrodo) en medios de diferentes valores de pHs, 7.4, 6.0 y 5.0. En la Figura 85. se han comparado la respuesta específica, obtenida con el inmunosensor preparado por inmovilización de Cp en concentración de 50 µg/mL, con la respuesta inespecífica, obtenida en ausencia de Cp inmovilizada. Los inmunosensores se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en la Parte Experimental, trabajando en todos los casos en ausencia de antígeno, y empleando 10 µL de anti-Cp 7.5 µg/mL y 10 µL de HRP-anti-IgG en dilución 1/750. El tiempo de incubación en todas las etapas fue de 45 min.

Como puede observarse en la Figura 85, cuando la inmovilización se realiza a pH 5.0, se obtiene una mayor respuesta específica. Este hecho se debe probablemente

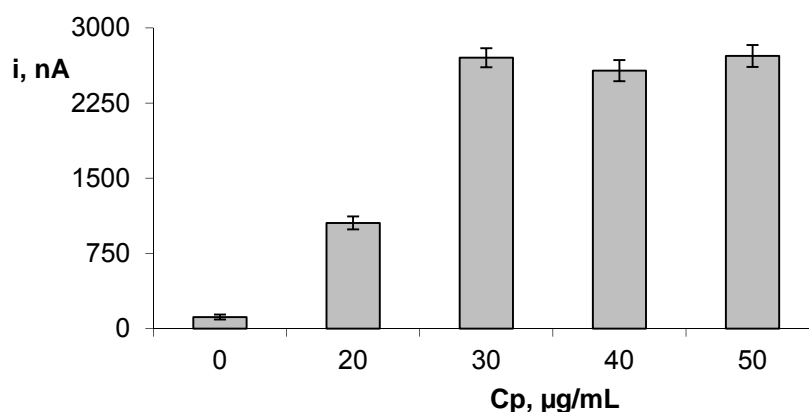
a que la Cp se encuentra a un pH inferior a su punto isoeléctrico y, en estas condiciones, las proteínas son pre-adsorbidas electrostáticamente sobre los restos de grupos carboxilo disociados no activados, facilitando así su unión covalente [Puertas, 2013]. Por otro lado, las respuestas no específicas son de muy baja magnitud en todos los casos, encontrándose la mayor relación entre la respuesta específica y la inespecífica ( $E/I = 25$ ) a pH 5.0, por lo que fue el medio escogido para llevar a cabo los estudios posteriores (Figura 85).



**Figura 85.** Influencia del medio de inmovilización de Cp: 10  $\mu$ L de Cp 0 ó 50  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ L de caseína 2% (45 min); 10  $\mu$ L de anti-Cp 7.5  $\mu$ g/mL (45min); 10  $\mu$ L de HRP-anti-IgG 1/750 (45min)

A continuación, se optimizó la concentración de Cp necesaria para saturar los grupos carboxilo activados presentes en la superficie del electrodo. Para ello se depositan 10  $\mu$ L de disoluciones de Cp preparadas en el intervalo de concentraciones de 20 a 50  $\mu$ g/mL y se deja hasta sequedad. Seguidamente se continúa la preparación de los inmunosensores en ausencia de antígeno, tal y como se describe en el apartado 4.5.3.1 de la Parte Experimental.

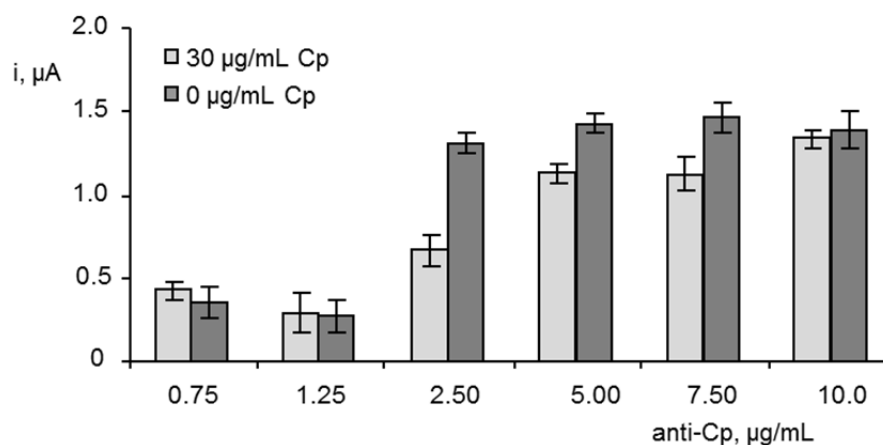
Como se observa en la Figura 86, la respuesta del inmunosensor aumenta con la concentración de Cp inmovilizada hasta un valor de 30  $\mu$ g/mL, estabilizándose a continuación. Estos resultados indican que esta concentración es suficiente para saturar los grupos carboxilo de la superficie del electrodo, por lo que fue la escogida para estudios posteriores.



**Figura 86.** Influencia de la concentración de Cp inmovilizada: 10 µL de caseína 2% (45 min); 10 µL de anti-Cp, 7.5 µg/mL (45min); 10 µL de HRP-anti-IgG 1/750 (45min).

### ***Influencia de la concentración de anti-Cp en la competición***

El estudio de la influencia de la concentración de anticuerpo anti-Cp se realizó comparando las respuestas del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE en ausencia y en presencia de Cp analito en la disolución del anticuerpo, es decir, en condiciones de competición, con el fin de seleccionar la que proporcione la mayor diferencia de corriente entre ambas situaciones. Para ello, se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones de anti-Cp en ausencia y en presencia de 30 µg/mL de Cp analito, se realizó una etapa de preincubación de 20 min bajo condiciones de agitación y, posteriormente, 10 µL de la disolución se incubaron durante 45 min sobre el electrodo. Los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 87.



**Figura 87.** Influencia de la concentración de anti-Cp: en presencia de 10 µg/mL de Cp analito (barras claras); en ausencia de Cp analito (barras oscuras); 10 µL de Cp 30 µg/mL inmovilizada; 10 µL de caseína 2% (45 min); 10 µL de anti-Cp 7.5 µg/mL+0 ó 30 µg/mL de Cp analito (45min); 10 µL de HRP-anti-IgG 1/750 (45min).

Como puede observarse en la Figura 87, a partir de una concentración de anticuerpo de 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , las respuestas obtenidas en ausencia de Cp analito alcanzan su nivel máximo, permaneciendo prácticamente constantes a partir de dicha concentración. Esto se debe probablemente a que el anticuerpo ha saturado la Cp inmovilizada sobre la superficie del electrodo. Si se comparan estas respuestas con las obtenidas en presencia de ceruloplasmina analito, se observa una mayor diferencia entre las corrientes para una concentración de anticuerpo de 2.50  $\mu\text{g/mL}$ , por lo que fue elegida como óptima para la preparación del inmunosensor.

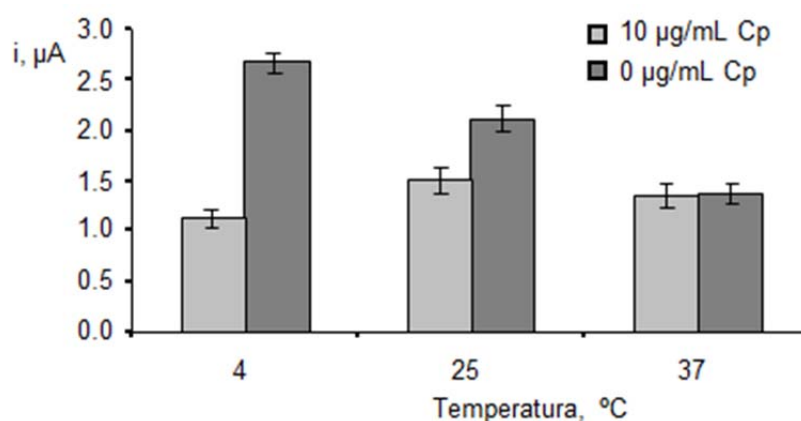
### ***Influencia del tiempo y la temperatura de unión anti-Cp-Cp***

Como ya se ha comentado, la preparación del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE requiere la formación del complejo antígeno-anticuerpo en disolución para después, depositar dicha disolución sobre el electrodo modificado con ceruloplasmina, estableciéndose la competición entre la Cp en disolución y la inmovilizada por los sitios de unión del Ab.

En primer lugar se estudió la influencia del tiempo de contacto entre el anticuerpo anti-Cp y la Cp analito en disolución. Para ello se compararon dos situaciones experimentales distintas. En la primera se preparó una disolución que contenía 2.5  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo y 50  $\mu\text{g/mL}$  del antígeno en un tubo eppendorf y se mantuvo en agitación a 4°C durante 20 min. Seguidamente, se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de la disolución sobre la superficie del electrodo Cp/MWCNT-SPCE y se incubó durante 45 min. En el segundo experimento se prescindió del periodo de tiempo de unión de la mezcla en disolución y se depositaron directamente 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de anti-Cp y antígeno sobre el electrodo, dejando incubar durante el mismo periodo de tiempo. Los resultados obtenidos demostraron que la primera situación era la más adecuada, ya que la relación de corriente obtenida entre la señal en ausencia y en presencia de antígeno fue más de un 25% superior a la obtenida sin tiempo de unión en disolución.

Seguidamente, se optimizó el tiempo de contacto del anticuerpo anti-Cp y el analito en disolución, comparando las medidas amperométricas con las obtenidas en ausencia de competición, empleando 10, 20, 30 y 45 min. La respuesta en presencia de antígeno en disolución fue menor para un tiempo de unión de 20 min.

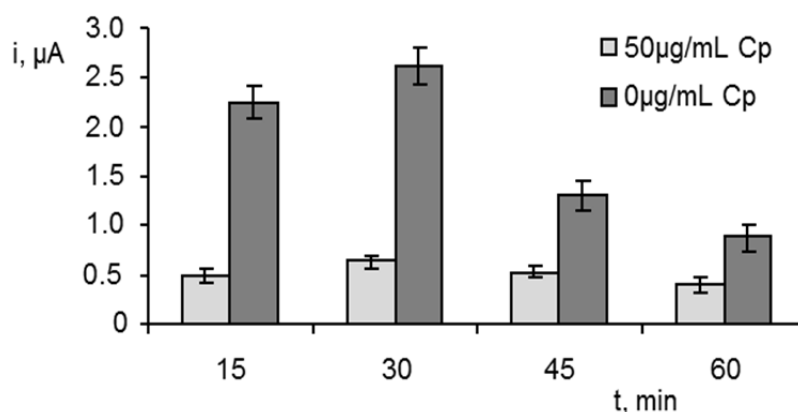
Finalmente, se estudió la influencia de la temperatura en la unión anti-Cp-antígeno en disolución, examinando las respuestas obtenidas en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cp analito y en ausencia del mismo y dejando transcurrir los 20 minutos de tiempo de unión a tres temperaturas diferentes: 4, 25 y 37°C. Los resultados obtenidos en este último estudio se han representado en la Figura 88, pudiéndose observar cómo la mejor relación de respuestas se obtiene a 4°C, debido probablemente a la mayor estabilidad del anticuerpo a la temperatura más baja.



**Figura 88.** Influencia de la temperatura durante el tiempo de unión anti-Cp-Cp (analito) sobre la respuesta del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE: en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cp analito (barras claras); en ausencia de Cp analito (barras oscuras); 10  $\mu\text{L}$  de Cp 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inmovilizada; 10  $\mu\text{L}$  de caseína 2% (45 min); 10  $\mu\text{L}$  anti-Cp de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0 ó 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cp analito, 20 + 45 min; 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-IgG 1/750 (45min).

### ***Influencia del tiempo de incubación de anti-Cp***

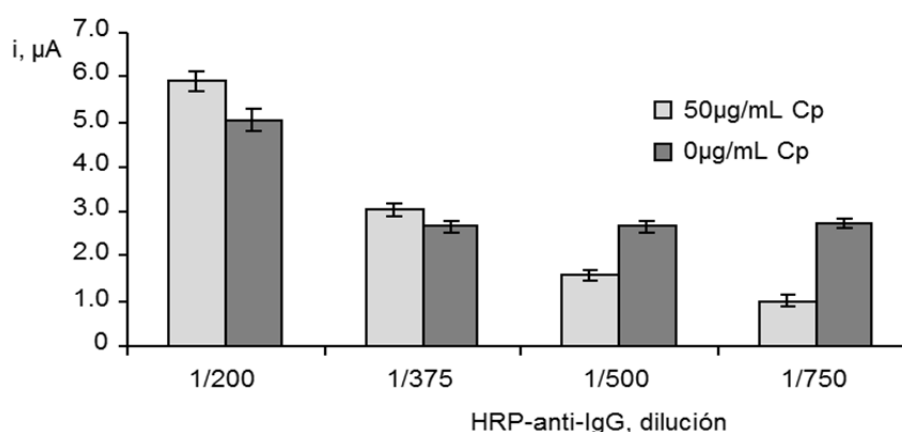
Se estudió la influencia del tiempo de incubación del anticuerpo sobre la superficie del electrodo Cp/MWCNT-SPCE. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 89. En este estudio también se compararon las señales de corriente obtenidas en presencia y en ausencia de antígeno en disolución, observándose que un tiempo de incubación de 30 min es el que proporciona la mayor diferencia de señal, por lo que se eligió como más adecuado.



**Figura 89.** Influencia del tiempo de incubación de anti-Cp: 10  $\mu\text{L}$  Cp 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  anti-Cp 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0 ó 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cp analito (20 min + tiempo variable); 10  $\mu\text{L}$  HRP-anti-IgG 1/750 (45min).

### ***Influencia de la concentración de HRP-anti-IgG***

Con el fin de optimizar la concentración del anticuerpo marcado se estudiaron las respuestas del inmunosensor preparado empleando distintas diluciones del reactivo HRP-anti-IgG en el intervalo de 1/200 a 1/750. Como puede apreciarse en la Figura 90, la mayor dilución es la que proporciona la mayor diferencia de respuestas en presencia y en ausencia de analito, por lo que fue la escogida para la preparación del inmunosensor.



**Figura 90.** Influencia de la concentración de HRP-anti-IgG: 10  $\mu\text{L}$  Cp 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de caseína 2% (45 min); 10  $\mu\text{L}$  de anti-Cp 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0 ó 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cp analito (20 min + 30 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-IgG (45min).

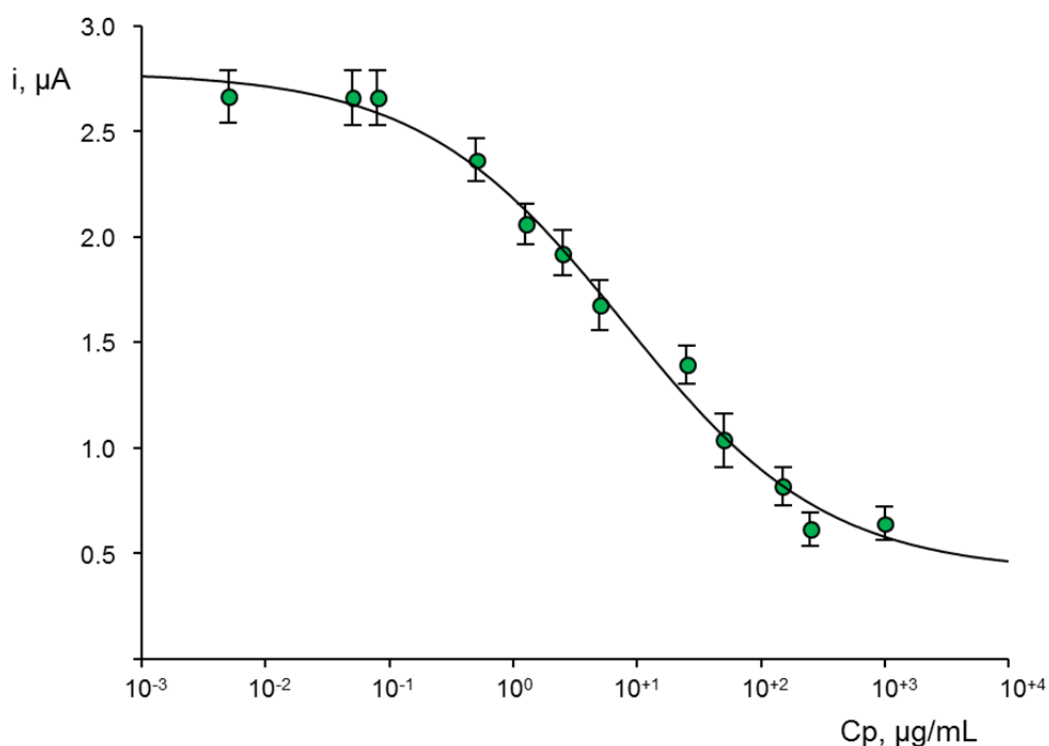
### ***Influencia del tiempo de incubación de HRP-anti-IgG***

Para optimizar el tiempo de incubación del HRP-anti-IgG se prepararon inmunosensores en las condiciones experimentales anteriores, empleando una dilución de HRP-anti-IgG de 1/750 y diferentes tiempos de incubación (15, 30, 45 y 60

min) sobre el conjugado anti-Cp/Cp/MWCNT-SPCE. La respuesta se mantiene constante a partir de 30 min, escogiéndose un tiempo de 45 min como más adecuado por proporcionar respuestas de mayor reproducibilidad.

### 5.3.1.3. Calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente y empleando la amperometría como técnica de medida, se obtuvo el calibrado para la determinación de ceruloplasmina. Como puede observarse en la Figura 91, presenta el hábito típico del formato competitivo, es decir, un incremento en la concentración de Cp analito disminuye la posibilidad de que el anticuerpo se enlace a la Cp inmovilizada en la superficie del electrodo, dando lugar a un descenso en la señal de corriente.



**Figura 91.** Calibrado de ceruloplasmina obtenido con el inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE

En la Tabla 31 se resumen las características analíticas del método desarrollado para la determinación de Cp con el inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNTs-SPCE. En primer lugar, se encontró un buen ajuste para la ecuación paramétrica que define la curva de corriente en función del logaritmo de la concentración de Cp ( $r=0.997$ ). Por otro lado, el intervalo lineal de dicho calibrado [ $i$ ,

$nA = (597 \pm 17) \log Cp + (2100 \pm 20)$  se extiende entre 0.07 y 250  $\mu\text{g/mL}$ , siendo el límite de detección de 0.021  $\mu\text{g/mL}$ . Cuando se comparan los resultados obtenidos con los proporcionados por el inmunosensor AP-Cp/anti-Cp-biotin/Strept-MBs/SPCE (Apdo. 5.1.3.4) se observa un aumento en el intervalo lineal en un orden de magnitud (0.025 - 20  $\mu\text{g/mL}$ ), sin pérdida significativa de sensibilidad, obteniéndose un límite de detección similar (0.018  $\mu\text{g/mL}$ ).

*Tabla 31.- Características analíticas del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/ /Cp/MWCNT-SPCE para la determinación de ceruloplasmina.*

Ecuación	$y = \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^h} + i_{m\acute{i}n}$
r	0.997
Intervalo lineal, $\mu\text{g/mL}$	0.07 - 250 r = 0.994
$EC_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$	$8 \pm 3$
Constante de Hill	$0.52 \pm 0.09$
Mínimo, nA	$400 \pm 200$
Máximo, nA	$2800 \pm 100$
LD, $\mu\text{g/mL}^*$	0.021
S, punto en ausencia de ceruloplasmina, n=5	34

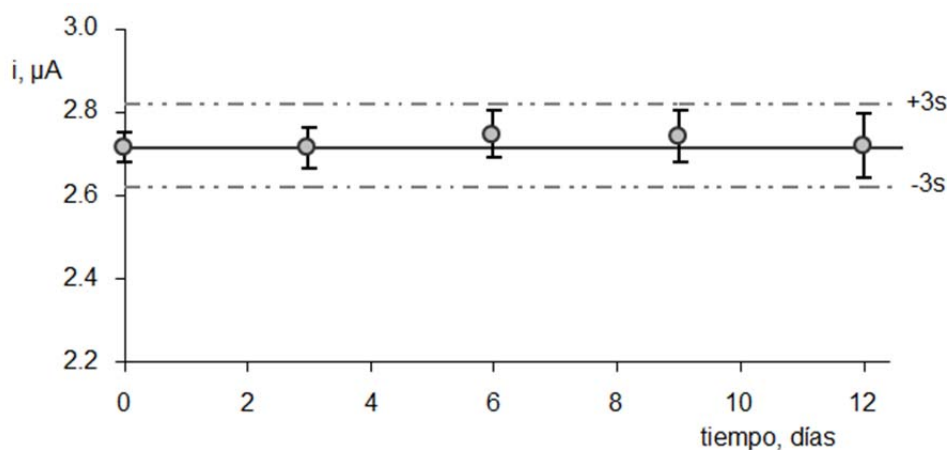
$$*LD = \left( \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

### **Reproducibilidad y tiempo de vida**

Con el fin de evaluar la reproducibilidad del procedimiento de construcción de los inmunosensores y de realización de las medidas, se fabricaron cinco dispositivos a partir de electrodos diferentes y se midió la respuesta amperométrica de disoluciones preparadas en ausencia de ceruloplasmina. La desviación estándar obtenida, %RSD = 1.2, pone de manifiesto el alto nivel de precisión con que se lleva a cabo la construcción de los inmunosensores y la detección amperométrica.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad de la modificación de la superficie de los MWCNT-SPCE con ceruloplasmina en diferentes días tras su almacenamiento a 4°C bajo condiciones de sequedad. Para ello, cada día se continúa el desarrollo del inmunosensor sobre el complejo almacenado y se mide la respuesta obtenida en ausencia de ceruloplasmina analito.

Como puede observarse en la Figura 92, las medidas realizadas se encuentran dentro de los límites de control de  $\pm 3s$  durante al menos 12 días, lo que pone de manifiesto la posibilidad de preparar el conjugado y almacenarlo para su posterior utilización.



**Figura 92.** Estabilidad de Cp/MWCNT-SPCE almacenado a 4°C en condiciones de sequedad. Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de Cp analito.

#### 5.3.1.4. Selectividad del inmunosensor

Para evaluar la selectividad del inmunosensor se compararon las respuestas amperométricas obtenidas, en ausencia de ceruloplasmina y en presencia de algunas sustancias potencialmente interferentes que pueden estar presentes en suero, como son: bilirrubina, hemoglobina, colesterol, BSA e inmunoglobulina G a los niveles de concentración normales en una dilución adecuada de la muestra de suero. También se evaluó la existencia o no de reactividad cruzada frente a ácido úrico y creatinina para evaluar la selectividad del inmunosensor en muestras de orina.

Como puede observarse en la Figura 93, las señales en presencia de los interferentes se encuentran dentro de los límites de control de  $\pm 2s$ , demostrando que es posible la determinación selectiva de Cp en este tipo de muestras.

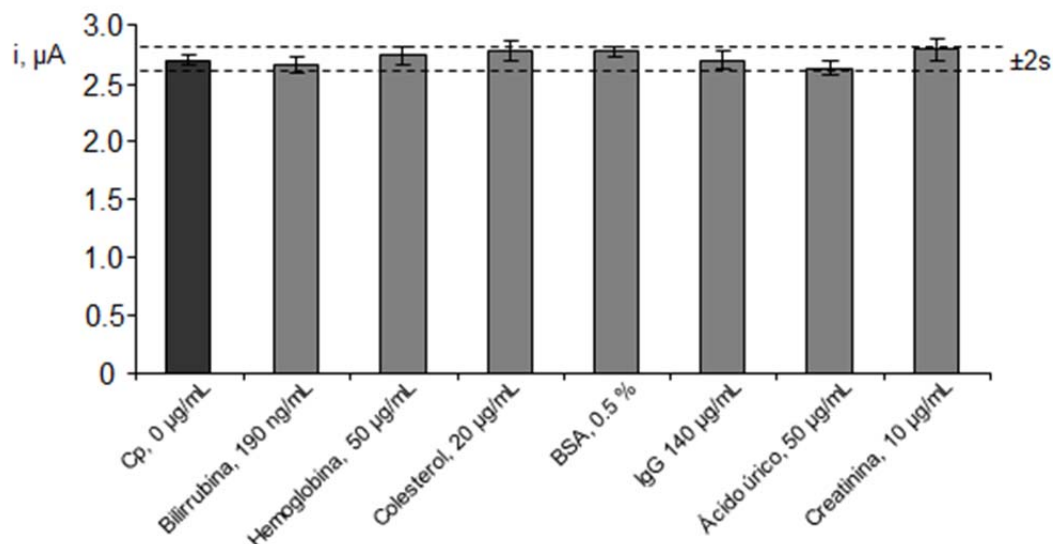


Figura 93. Estudio de reactividad cruzada. Señales obtenidas en ausencia de Cp analito.

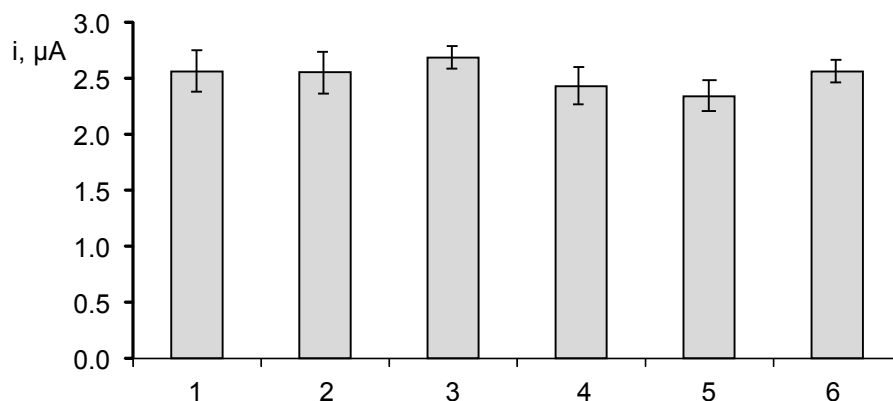
### 5.3.1.5. Aplicación a la determinación de ceruloplasmina en muestras de suero y orina enriquecidas

Para demostrar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado al análisis de muestras reales de interés clínico, se puso a punto un método de determinación de Cp en suero y orina enriquecidos.

#### **Suero humano**

Se empleó un tipo de suero humano deficiente en progesterona. De forma previa al análisis, el suero, liofilizado, se reconstituyó con 1 mL de PBS de pH 7.4, mezclando mediante agitación suave. La muestra de suero se enriqueció con diferentes concentraciones de Cp del orden de las que pudieran encontrarse en muestras de suero de pacientes que presentan deficiencia en esta proteína.

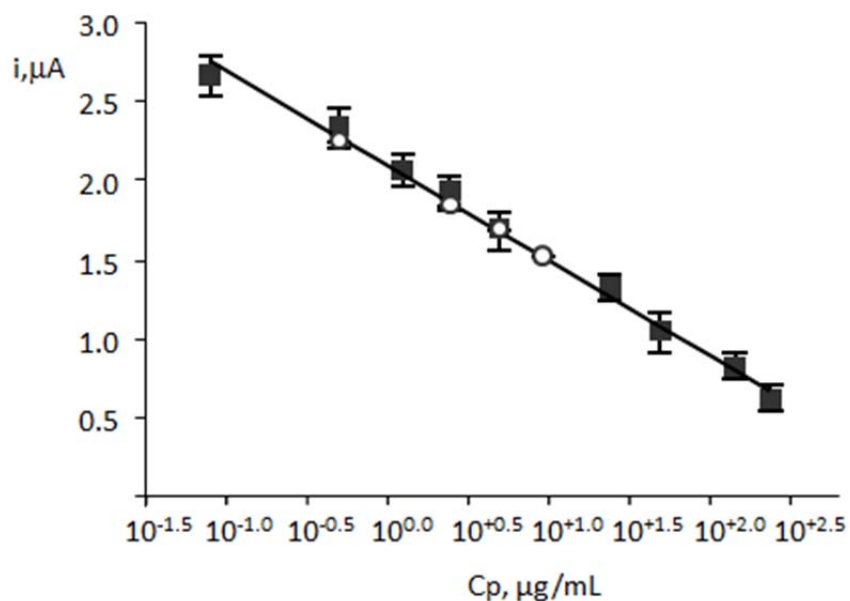
En primer lugar se estudió la existencia o no de efecto matriz, con el fin de establecer el grado de dilución que debía emplearse para evitar o, al menos, minimizar dicho efecto. Los resultados obtenidos a partir de la medida de disoluciones patrón y de sueros a los que se aplicaron distintas diluciones, se han representado en la Figura 94.



**Figura 94.** Estudio de la influencia de la dilución de suero en PBS sobre la respuesta del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE en ausencia de Cp analito. PBS' (1); suero sin diluir (2); diluciones del suero (3-6): 1/10 (3); 1/100 (4); 1/300 (5); 1/1000 (6)

Como puede observarse, las corrientes obtenidas para los patrones y la muestra sin diluir son muy similares, con valores medios de  $(2.55 \pm 0.13) \mu\text{A}$  y  $(2.55 \pm 0.11) \mu\text{A}$ . Por otro lado, los resultados obtenidos para la medida de las muestras preparadas con diferentes grados de dilución no presentan grandes diferencias con respecto a los anteriores. El valor medio de la corriente calculado con los datos correspondientes a los cuatro niveles de dilución fue de  $(2.50 \pm 0.14) \mu\text{A}$ . La comparación estadística de estos valores con los patrones y el suero sin diluir permitió comprobar que no existían diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de resultados. De estos resultados se deduce que la determinación de Cp en este tipo de muestras no requiere una dilución previa de la misma. Sin embargo, éstas deberán diluirse adecuadamente, cuando sea necesario ajustar su concentración al intervalo lineal del calibrado.

Con el fin de confirmar la ausencia de efecto matriz, se estableció un calibrado a partir de disoluciones preparadas con suero enriquecido a diferentes niveles de concentración, entre 1 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de Cp. Posteriormente, se adicionó un volumen igual de anti-Cp 10  $\mu\text{g/mL}$ , por lo que las concentraciones finales medidas fueron la mitad de las indicadas. En la Figura 95 se ha representado dicho calibrado superpuesto al intervalo recto obtenido para los patrones de Cp, encontrándose un ajuste perfecto entre ambos.



**Figura 95.** Superposición de las señales obtenidas para la muestra de suero enriquecida (○) al calibrado de estándares de ceruloplasmina (■) obtenido con el inmunosensor HRP-anti-IgG/ /anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE

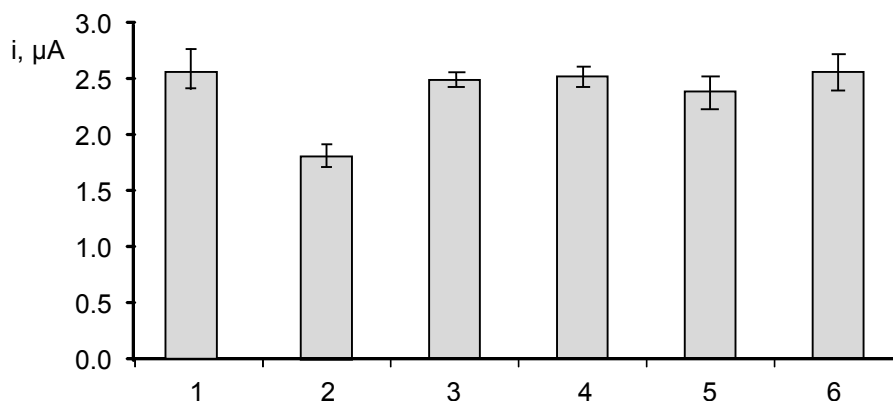
Los resultados obtenidos en el análisis de cuatro muestras diferentes de suero humano enriquecido con Cp a niveles de concentración de 0.5, 2.5, 5.0 y 10 µg/mL se han resumido en la Tabla 32. Como puede observarse, los porcentajes de recuperación son buenos, con valores próximos al cien por cien en todos los casos, y una aceptable precisión, con porcentajes de la desviación estándar relativa (% RSD) comprendidos entre el 6 y 9 %.

*Tabla 32.- Determinación de ceruloplasmina en suero humano enriquecido.*

Cp, µg/mL	Cp encontrada, µg/mL	Recuperación, %
1.0	1.02 ± 0.08	102 ± 8
5.0	5.2 ± 0.3	103 ± 7
10	10.4 ± 0.6	104 ± 6
20	20.2 ± 1.8	101 ± 9

### **Orina enriquecida**

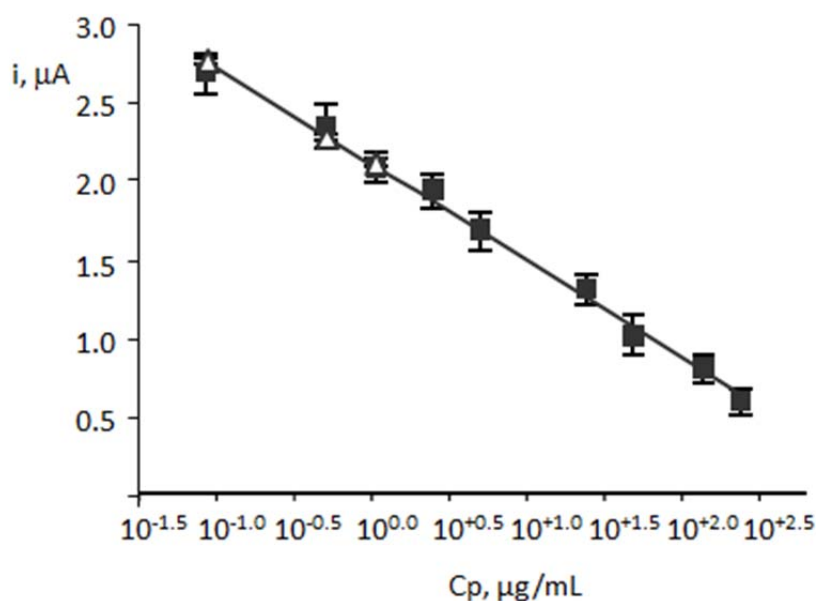
Para la determinación de Cp en una muestra de orina se empleó Liquichek Urine Chemistry Control. Primeramente, se estudió la influencia del pH de la muestra y, de forma análoga a la muestra de suero, se evaluó la influencia de la dilución de la muestra en PBS sobre la respuesta obtenida en ausencia de analito. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 96.



**Figura 96.** Estudio de la influencia del pH y la dilución de orina en PBS sobre la respuesta del inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE en ausencia de Cp analito. PBS' (1); Orina pH 5 (2); Orina pH 7.4 (3); Orina 1/2 (4); Orina 1/10 (5); Orina 1/500 (6)

Como puede observarse en la Figura, es necesario una dilución 1/2 del control de orina o, si se trabaja con la muestra sin diluir, un ajuste previo del pH a 7.4 por adición de fosfato monoácido de potasio. Este último procedimiento fue el elegido para llevar a cabo la determinación de ceruloplasmina en orina.

A continuación, se construyó un calibrado a partir de disoluciones preparadas con orina enriquecida a diferentes niveles de concentración con el fin de confirmar la ausencia de efecto matriz, en el intervalo comprendido entre 0.08 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de Cp. En la Figura 97 se ha representado dicho calibrado, superpuesto al intervalo recto obtenido para disoluciones estándar de ceruloplasmina. La ecuación de regresión obtenida en orina ( $i, \text{nA} = -(590 \pm 20) \log ([\text{Cp}], \mu\text{g/mL}) + (2090 \pm 20)$ ) revela que no existen diferencias estadísticamente significativas entre este valor de la pendiente y la obtenida con el calibrado de patrones de Cp ( $597 \pm 17$ ) nA para un nivel de significación de 0.05.



**Figura 97.** Superposición de las señales obtenidas para la muestra de orina enriquecida ( $\Delta$ ) al calibrado de estándares de ceruloplasmina ( $\blacksquare$ ) obtenido con el inmunosensor HRP-anti-IgG/anti-Cp+Cp/Cp/MWCNT-SPCE

Los resultados obtenidos en el análisis de tres muestras de orina enriquecidas con Cp a niveles de concentración de 0.08, 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  por interpolación en el calibrado de patrones de ceruloplasmina se muestran en la siguiente tabla. Se obtuvieron porcentajes de recuperación próximos al 100% en todos los casos, con valores de la desviación estándar relativa, RSD, comprendidos entre el 7 y el 8%.

*Tabla 33.- Determinación de ceruloplasmina en orina enriquecida.*

Cp, $\mu\text{g/mL}$	Cp encontrada, $\mu\text{g/mL}$	Recuperación, %
0.08	$0.079 \pm 0.006$	$99 \pm 7$
0.5	$0.52 \pm 0.04$	$103 \pm 8$
1	$0.99 \pm 0.10$	$100 \pm 10$

### 5.3.1.6. Conclusiones

Las características analíticas obtenidas ponen de manifiesto que el inmunosensor amperométrico desarrollado permite la determinación sensible y selectiva de ceruloplasmina.

Además, es de destacar la buena estabilidad de los inmunoconjugados Cp/MWCNT-SPCE, sin pérdida apreciable en la intensidad de las respuestas

amperométricas obtenidas durante al menos 12 días, lo que posibilita su preparación y almacenamiento hasta su uso.

Una ventaja muy importante del inmunosensor desarrollado frente al magnetoinmunosensor es la inexistencia de efecto matriz en las muestras de suero y orina a pH de 7.4, evitando la necesidad de realizar una dilución previa de la muestra. Este hecho permite la determinación rápida y fiable de bajas concentraciones de ceruloplasmina en este tipo de muestras.



### 5.3.2. Inmunosensor para adiponectina empleando nanotubos de carbono de pared doble

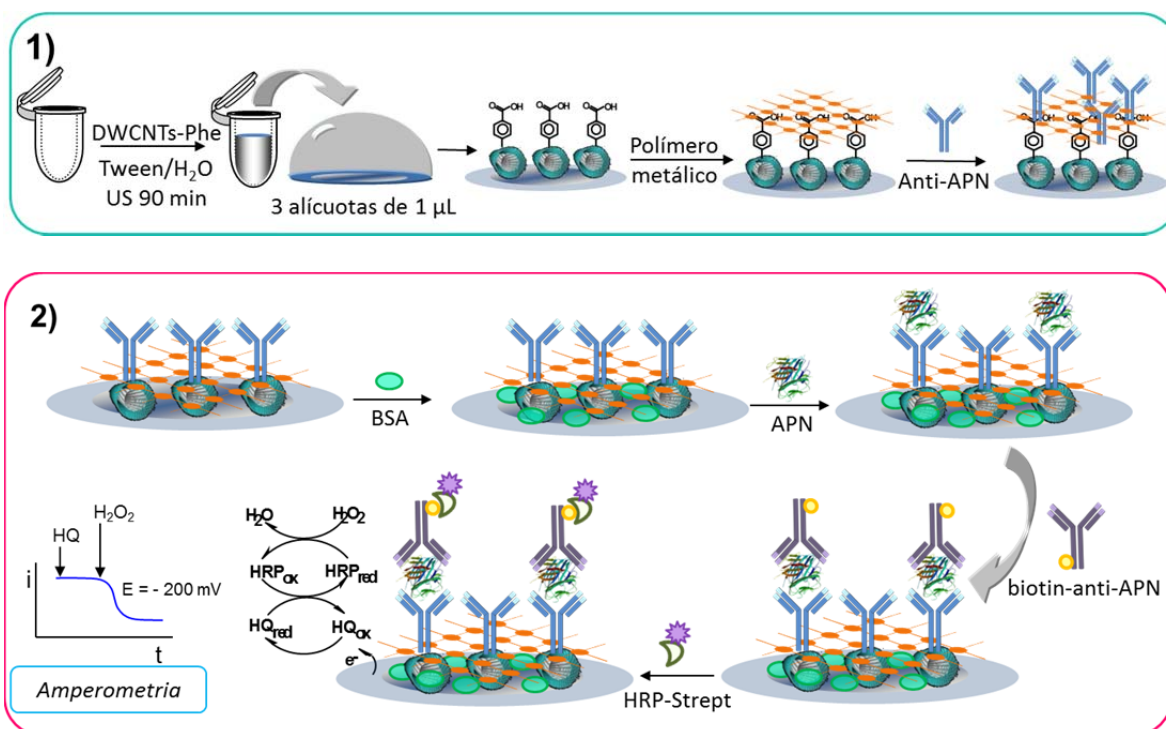
La adiponectina es la adipocitoquina que presenta una mayor expresión en el adipocito y, en condiciones fisiológicas normales, se expresa exclusivamente en éstos. En plasma se encuentra presente en concentraciones de 5-30  $\mu\text{g/mL}$ . Una de las características más importantes de la adiponectina es que, a diferencia de otras adipocitoquinas, su expresión en el tejido adiposo y su concentración sérica se correlaciona negativamente con el índice de masa corporal.

En este trabajo se describe por primera vez un inmunosensor electroquímico para adiponectina basado en el empleo de nanotubos de carbono de pared doble (DWCNTs), nanomaterial perteneciente a la familia de los nanotubos de carbono de pared múltiple, que hasta el momento sido muy poco utilizado para la construcción de biosensores electroquímicos. Los DWCNTs son especialmente interesantes cuando se requiere que el nanomaterial esté funcionalizado, ya que solo la capa externa es modificada, conservando el tubo interno sus propiedades.

Por otro lado, como ya se ha comentado en la introducción, se utiliza un producto comercial denominado Mix&Go<sup>TM</sup> que es un material polimérico compuesto de iones metálicos unidos a diferentes ligandos, capaces de unirse también a grupos donadores de electrones presentes en superficies electrónicas modificadas y a grupos donantes de las proteínas. Concretamente, en este trabajo, el Mix&Go<sup>TM</sup> se utiliza para unirse a los grupos carboxilo de los nanotubos de carbono de pared doble y, probablemente, a los azúcares de la región  $F_c$  del anticuerpo anti-APN. Las mayores ventajas que reporta el empleo de este material son, por un lado, que no es necesario realizar una activación previa de los grupos enlazantes, por ejemplo, utilizando los reactivos EDC/NHSS (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida), de este modo los anticuerpos se encuentran inmovilizados de forma orientada además de estable.

### 5.3.2.1. Configuración del inmunosensor

En la Figura 98 se muestra un esquema de la construcción y el funcionamiento del inmunosensor preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.5.3.2). El inmunosensor emplea electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared doble funcionalizados con grupos 4-carboxifenilos. Tras la activación de los grupos carboxílicos con el reactivo Mix&Go, se inmoviliza, de forma orientada, el anticuerpo de captura, anti-APN. Seguidamente, se lleva a cabo una etapa de bloqueo de la superficie libre, se incorpora el antígeno y, a continuación, el anticuerpo secundario biotinilado, biotin-anti-APN. La monitorización de la reacción de afinidad Ag-Ab se lleva a cabo empleado estreptavidina marcada con peroxidasa. Para la obtención de la señal analítica se emplea hidroquinona como mediador redox y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato enzimático, registrándose la señal amperométrica a  $-0.20\text{ V}$ .

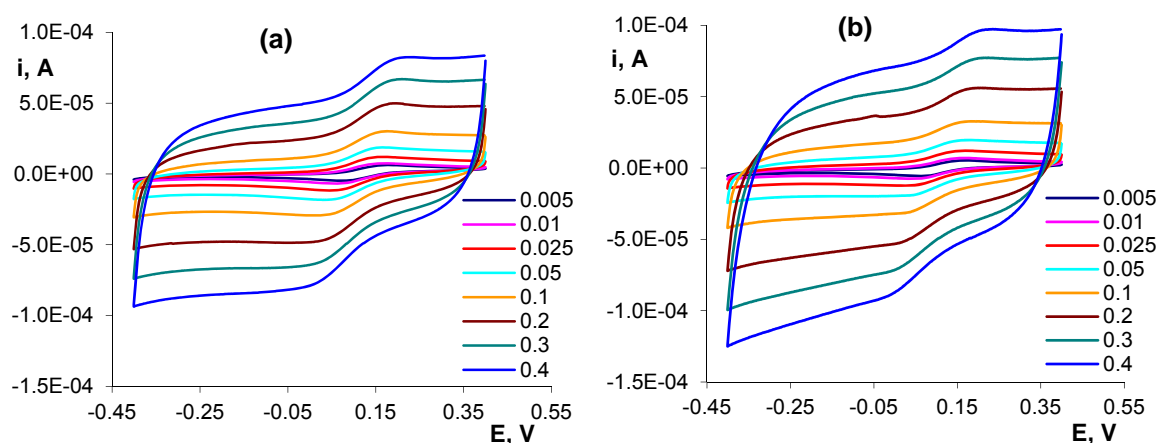


**Figura 98.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor HRP-Strept/ biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE

### 5.3.2.2. Caracterización de los nanotubos de pared doble (DWCNT)

#### *Cálculo la constante de velocidad heterogénea, $k^0$*

En la Figura 99 se muestran los voltamperogramas cíclicos de una disolución acuosa de ferricianuro 1 mM en medio KCl 0.1 M de pH 3.0 sobre el electrodo serigrafiado modificado con nanotubos de pared doble carboxilados, HOOC-Phe-DWCNT/SPCE a velocidades de barrido comprendidas entre 5 y 400 mV/s. Asimismo, con fines comparativos se han registrado los voltamperogramas sobre un electrodo modificado con nanotubos de pared simple funcionalizados del mismo modo, HOOC-Phe-SWCNTs/SPCE (Figura 99b).



**Figura 99.** Voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido sobre HOOC-Phe-DWCNT/SPCE (a) y HOOC-Phe-SWCNT/SPCE (b) en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  1 mM en medio KCl 0.1 M de pH 3.

Como puede observarse, el comportamiento voltamperométrico en ambas superficies es similar, aunque se obtiene una mayor corriente de fondo cuando se emplean HOOC-Phe-SWCNTs.

A partir de los potenciales de pico de los voltamperogramas anteriores para diferentes velocidades de barrido de potencial se ha calculado la constante de velocidad heterogénea,  $k^0$ , de la reacción electroquímica del ferrocianuro sobre ambas superficies, mediante el método de Nicholson [Nicholson, 1965], que hace uso de la siguiente ecuación:

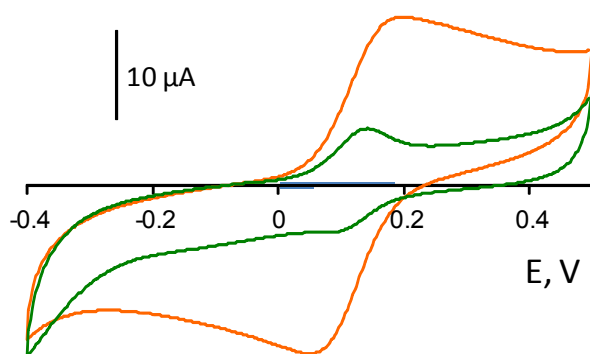
$$k^0 = \Psi \left[ D_O \pi \nu \frac{nF}{RT} \right]^{1/2} \left( \frac{D_R}{D_O} \right)^{\alpha/2}$$

donde  $v$  es la velocidad de barrido de potencial y los coeficientes de difusión del ferrocianuro,  $D_R$ , y del ferricianuro,  $D_O$ ,  $6.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  y  $7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , respectivamente. El parámetro adimensional  $\Psi$  se calculó a partir de la separación de los potenciales de los picos de oxidación y de reducción,  $\Delta E_p$  y asumiendo un valor del coeficiente  $\alpha$  igual a 0.5 [Nicholson, 1965].

Los valores de las constantes de velocidad obtenidos fueron  $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ cm/s}$  y  $(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ , para los electrodos modificados HOOC-Phe-DWCNTs/SPCE y HOOC-Phe-SWCNTs/SPCE, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados indica que ambos valores son diferentes ( $t_{\text{exp}} 2.357 > t_{\text{teór}} 2.086$ ), lo que pone de manifiesto una cinética electroquímica más rápida sobre los nanotubos de pared doble, estando de acuerdo con los resultados reportados por Moore para superficies de silicio funcionalizadas con grupos aminofenilos y nanotubos de pared doble o de pared simple (Si-aminofenil-DWCNTs y Si-aminofenil-SWCNTs) empleando  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$  como sistema redox [Moore, 2011]. Asimismo, el valor de  $k^0$  para HOOC-Phe-SWCNTs/SPCE es concordante con el único dato encontrado en la bibliografía, de  $1.31 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$  para una superficie de carbono vitrificado modificado con nanotubos de pared simple, GCE/SWCNTs, empleando  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  como sistema redox [Salinas-Torres, 2011].

### ***Caracterización de anti-APN/DWCNTs/SPCE***

En la Figura 100 se muestran los voltamperogramas cíclicos sobre HOOC-Phe-DWCNT/SPCE y anti-APN/DWCNT/SPCE en una disolución acuosa de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1.0 mM preparada en PBS 0.1 M de pH 7.4. Como era de esperar, la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie electroquímica produce un descenso acusado de las corrientes de pico de oxidación y de reducción debido al carácter aislante de la biomolécula inmovilizada.



**Figura 100.** Voltamperogramas cíclicos sobre HOOC-Phe-DWCNT/SPCE (—) y anti-APN/DWCNT/SPCE (—) en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1.0 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4;  $v = 50$  mV/s

### 5.3.2.3. Optimización de las variables experimentales

Con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad y el intervalo de linealidad más amplio para la determinación de adiponectina, se optimizaron las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del inmunosensor. A modo de resumen, en la Tabla 34 se recogen las variables estudiadas, los intervalos valorados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

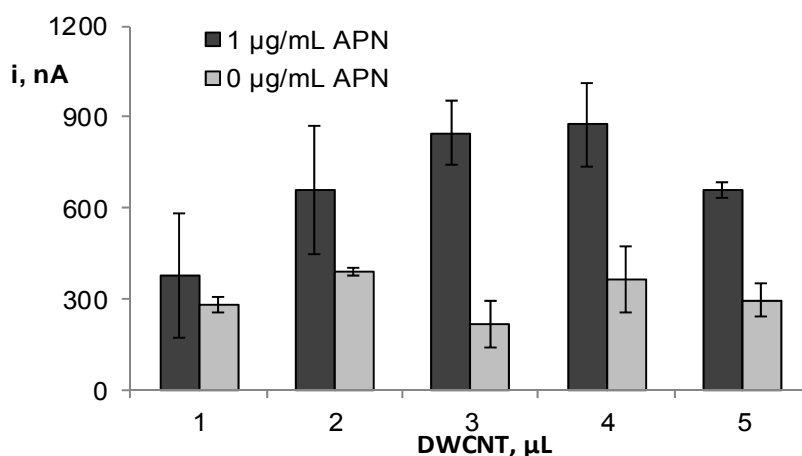
*Tabla 34: Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor HRP-Strept/biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE para la determinación de adiponectina*

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Cantidad de DWCNT, $\mu\text{L}$	1 - 5	3
Activación	Mix&Go, EDC/NHSS	Mix&Go
anti-APN, dilución	1/150 – 1/37.5	1/75
$t_{\text{inc}}$ APN, min	15 - 60	60
biotin-anti-APN, $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 – 7.5	2
$t_{\text{inc}}$ biotin-anti-APN, min	15 – 60	15
HRP-Strept, dilución	1/2000 - 1/500	1/1000
$t_{\text{inc}}$ HRP-Strept, min	15 – 60	15
Agente bloqueante	caseína, BSA, leche	BSA
BSA, %	1, 2, 5	2
$t_{\text{inc}}$ BSA, min	15 - 60	30

### ***Influencia del volumen de DWCNTs***

En primer lugar se estudió el volumen de la suspensión de nanotubos de carbono de pared doble carboxilados empleado para la modificación de la superficie

electrónica. Para ello se realizaron adiciones sucesivas de 1  $\mu\text{L}$  de dicha suspensión, dejando evaporar cada vez el disolvente, con el fin de evitar que la suspensión modifique el electrodo auxiliar o de referencia del SPCE. Como puede observarse en la Figura 101, un volumen de 3  $\mu\text{L}$  es el que proporciona la mejor relación de señales en ausencia y en presencia de adiponectina, por lo que fue el valor elegido para estudios posteriores.



**Figura 101.** Influencia del volumen de DWCNTs: 3  $\mu\text{L}$  de Mix&Go (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de anti-APN 1/75 (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de leche al 50% (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de APN 0 ó 1  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de biotín-anti-APN 1  $\mu\text{g/mL}$  (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Activación de la superficie electrónica***

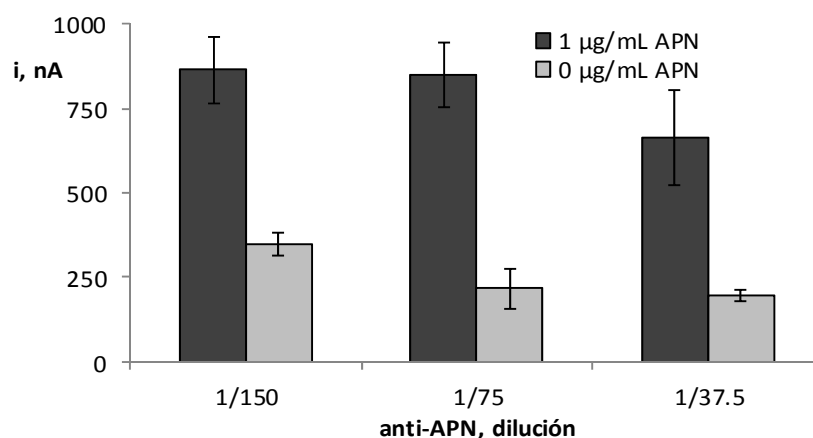
La inmovilización del anticuerpo de captura requiere la activación de los grupos carboxílicos presentes en los nanotubos de carbono de pared doble. Para ello se ha realizado un estudio comparativo aplicando dos procedimientos diferentes. El primero de ellos emplea el sistema EDC/NHSS, permitiendo la unión covalente de la biomolécula, mientras que el segundo hace uso del Mix&Go, un material polimérico de complejos metálicos, para la inmovilización orientada del anticuerpo.

Las medidas realizadas con inmunosensores preparados en ausencia y en presencia de 1  $\mu\text{g/mL}$  de APN empleando una dilución 1/75 del anticuerpo anti-APN y 1  $\mu\text{g/mL}$  biotín-anti-APN ponen de manifiesto una mejor relación de señales específica/inespecífica cuando la activación se lleva a cabo empleando el reactivo Mix&Go respecto del sistema EDC/NHSS (6.4 frente a 2.2). Este hecho se debe fundamentalmente a la reducción considerable de la señal inespecífica obtenida empleando el reactivo Mix&Go.

### ***Influencia de la concentración de anti-APN***

La concentración de anticuerpo de captura se optimizó depositando 10  $\mu\text{L}$  de disoluciones de anti-APN en el intervalo de dilución de 1/37.5 a 1/150 preparadas en regulador MES a pH 5.0 sobre la superficie de electrodos HOOC-Phe-DWCNT/SPCE previamente activados mediante tratamiento con disolución Mix&Go durante 1 hora, tal y como recomienda la casa comercial suministradora. Posteriormente, se continúa con las siguientes etapas del inmunoensayo, es decir, bloqueo en este caso con leche al 50%, incubación en las disoluciones del antígeno y del anticuerpo biotinilado y, finalmente, en una disolución de HRP-Strept. Con fines comparativos, se realizaron experimentos análogos en ausencia de adiponectina.

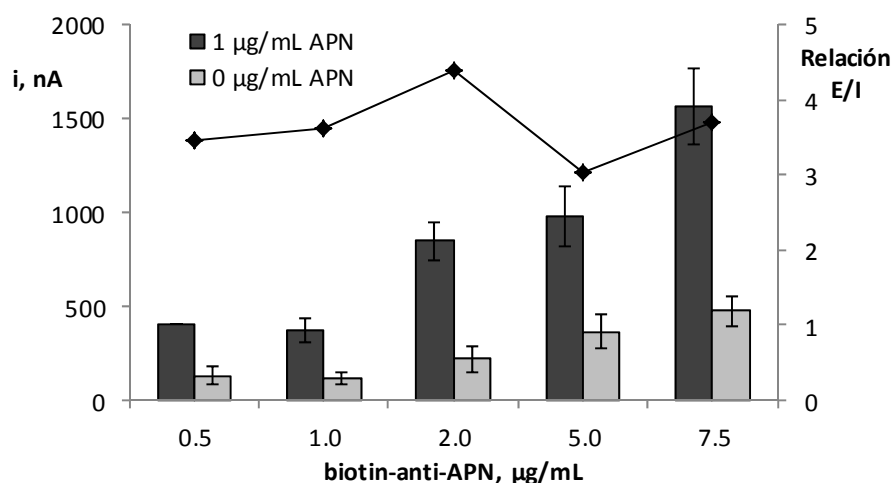
Como se observa en la Figura 102, los valores de intensidad de corriente en presencia de adiponectina disminuyen al aumentar la concentración del anticuerpo de captura, probablemente como consecuencia de un impedimento estérico que dificulta la formación de los complejos antígeno-anticuerpo para elevadas concentraciones de anticuerpo inmovilizado. Asimismo, se observa un incremento de la señal inespecífica, en ausencia de adiponectina, a medida que disminuye la concentración de anticuerpo, lo que se atribuye a un menor recubrimiento de la superficie electródica. La mejor relación entre ambas señales se obtuvo para la dilución 1/75, por lo que fue elegida para estudios posteriores.



**Figura 102.** Influencia de la concentración de anti-APN: 3  $\mu\text{L}$  de DWCNT; 3  $\mu\text{L}$  de Mix&Go (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de anti-APN (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de leche al 50% (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de APN 0 ó 1  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-APN 1  $\mu\text{g/mL}$  (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia de la cantidad de biotin-anti-APN***

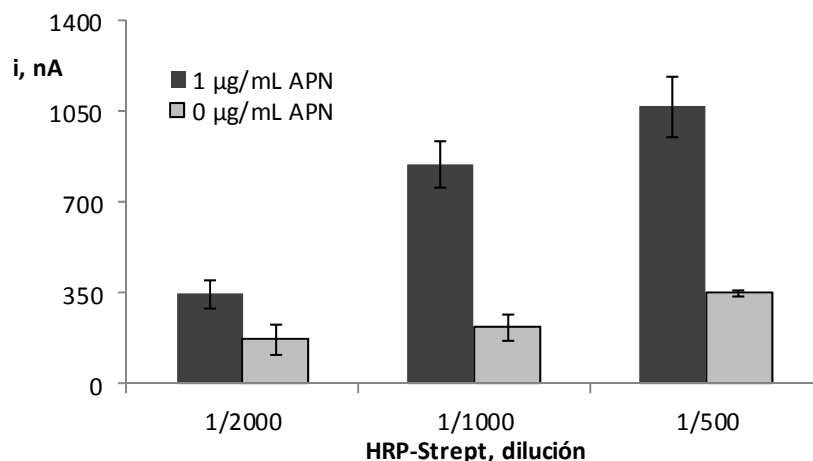
La influencia de la concentración del anticuerpo biotinilado de detección sobre la señal del inmunosensor se estudió en el intervalo de 0.5 a 7.5  $\mu\text{g/mL}$ . Como puede observarse en la Figura 103, la relación de señales en presencia y en ausencia de adiponectina es mayor para la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  de biotin-anti-APN.



**Figura 103.** Influencia de la concentración de biotin-anti-APN sobre la corriente en presencia y en ausencia de APN y sobre la relación de señales correspondiente (—◆—): 3  $\mu\text{L}$  de DWCNT; 3  $\mu\text{L}$  de Mix&Go (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de anti-APN 1/75 (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de leche al 50% (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de APN 0 ó 1  $\mu\text{g/mL}$  (60 min); 5  $\mu\text{L}$  de biotin-anti-APN (30 min); 5  $\mu\text{L}$  de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

### ***Influencia de la cantidad de HRP-Strept***

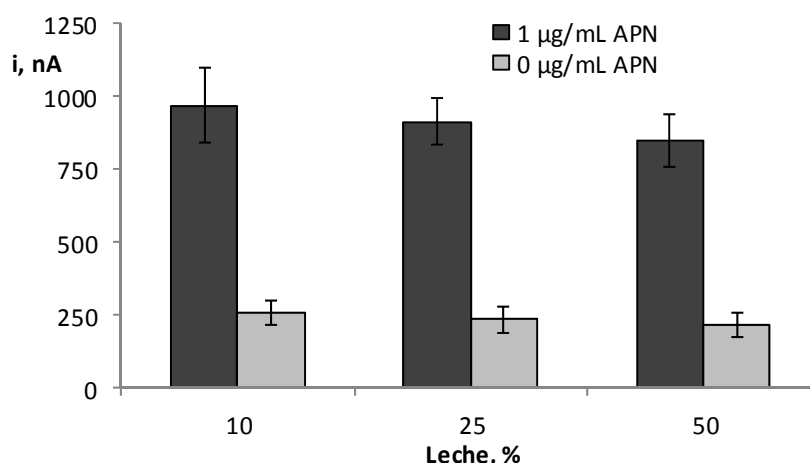
Otra variable experimental importante en el desarrollo del inmunosensor fue la dilución del conjugado comercial de HRP-Strept para marcar enzimáticamente el anticuerpo de detección mediante un enlace biotina-Strept, ya que la concentración del marcador determina en gran parte la sensibilidad del sensor desarrollado [Ricci, 2012]. Como se muestra en la Figura 104, se estudiaron factores de dilución 1/500, 1/1000 y 1/2000, registrándose la máxima relación de intensidad de corriente entre la señal específica e inespecífica empleando un factor de 1/1000, valor seleccionado para llevar a cabo estudios posteriores.



**Figura 104.** Influencia de la cantidad de HRP-Strept: 3 µL de DWCNT; 3 µL de Mix&Go (60 min); 5 µL de anti-APN 1/75 (60 min); 5 µL de leche al 50% (30 min); 5 µL de APN 0 ó 1 µg/mL (60 min); 5 µL de biotin-anti-APN 2 µg/mL (30 min); 5 µL de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

#### ***Influencia del porcentaje de leche en la disolución bloqueante***

La presencia de caseínas en la leche se aprovechó para emplearla como agente de bloqueo de los grupos residuales activados de la superficie modificada del electrodo, y así minimizar adsorciones inespecíficas posteriores. Los resultados obtenidos en el estudio de optimización del porcentaje de la leche semidesnatada empleada (Figura 105), demostraron que un 25% era el más adecuado, ya que en estas condiciones se obtiene una relación ligeramente superior entre la intensidad en presencia y ausencia de APN.



**Figura 105.** Influencia de la concentración de leche: 3 µL de DWCNT; 3 µL de Mix&Go (60 min); 5 µL de anti-APN 1/75 (60 min); 5 µL de leche (30 min); 5 µL de APN 0 ó 1 µg/mL (60 min); 5 µL de biotin-anti-APN de 2 µg/mL (30 min); 5 µL de HRP-Strept 1/1000 (30 min).

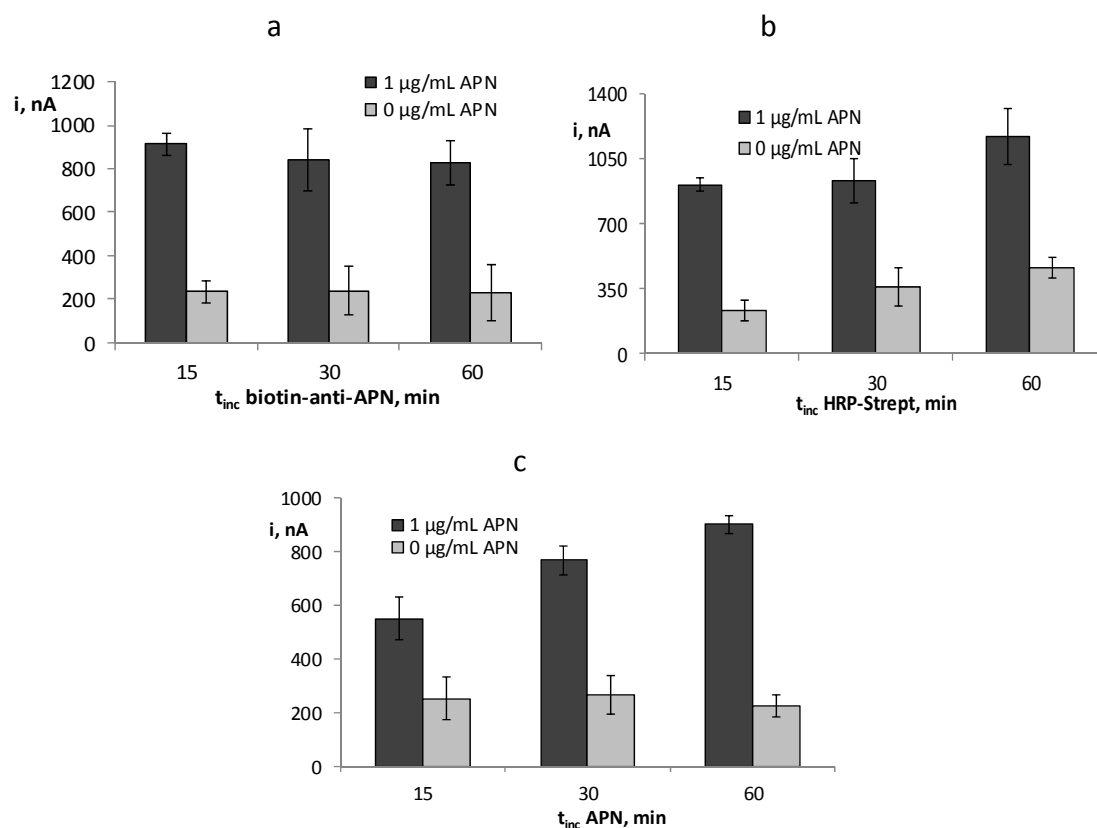
### **Influencia de los tiempos de incubación de biotin-anti-APN, de HRP-Strept y de APN**

Una vez optimizadas las concentraciones de los inmunorreactivos, se eligieron los tiempos de incubación más adecuados para cada una de las etapas.

En primer lugar se estudió el tiempo de incubación en el anticuerpo de detección, biotin-anti-APN, en el Intervalo de 15 a 60 min, en ausencia y en presencia de APN. Los resultados mostrados en la Figura 106a indican que un tiempo de 15 min es suficiente para llevar a cabo la reacción de afinidad Ag-Ab.

Usando el mismo criterio, se eligió un período de 15 min de incubación en la disolución de HRP-Strept (Figura 106b).

Finalmente, se evaluó el tiempo requerido para la formación de los inmunocomplejos evaluando la respuesta amperométrica de varios inmunosensores preparados en ausencia y en presencia de 1  $\mu\text{g/mL}$  APN empleando tiempos de 15, 30 ó 60 min. En la Figura 106c se muestra que la mejor relación de señales se obtuvo con una hora de incubación.



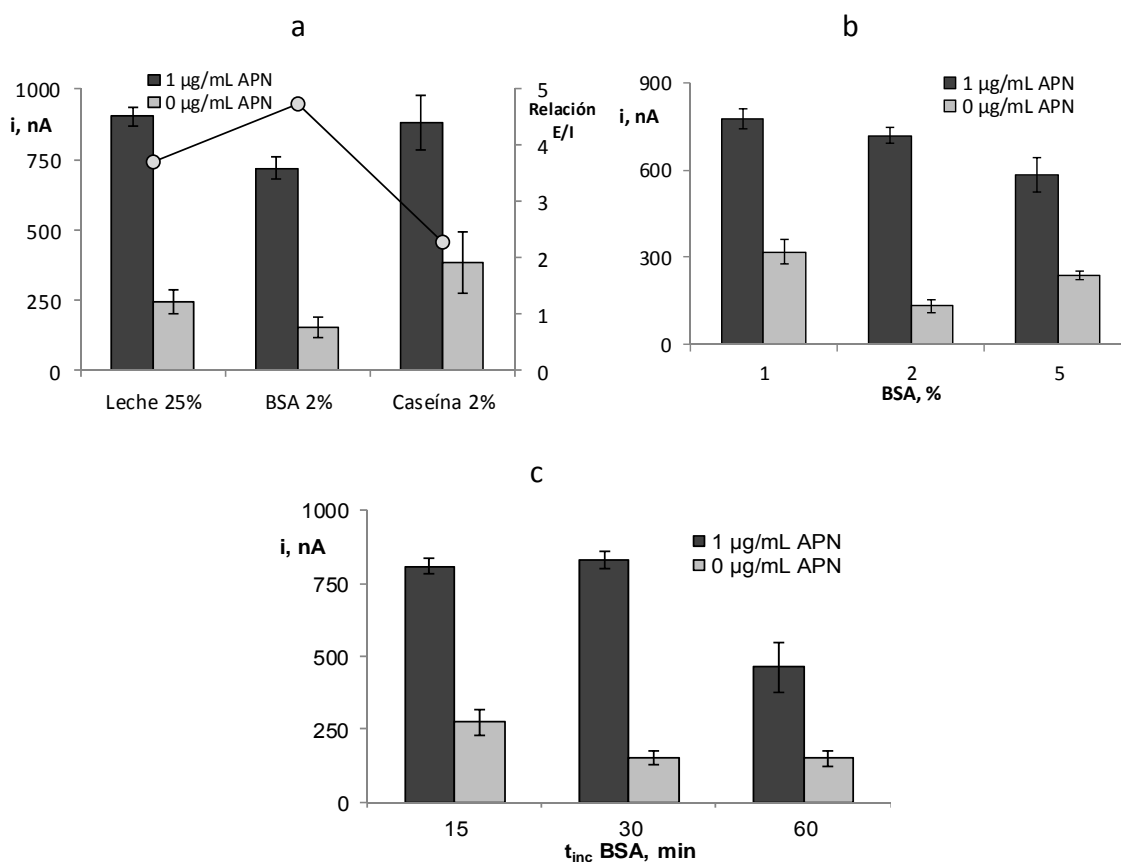
**Figura 106.** Influencia del tiempo de incubación en las disoluciones de biotin-anti-APN, de HRP-Strept y adiponectina: 3 µL de DWCNT; 3 µL de Mix&Go (60 min); 5 µL de anti-APN 1/75 (60 min); 5 µL de leche al 50% (30 min); 5 µL de APN 0 ó 1 µg/mL; 5 µL de biotin-anti-APN 2µg/mL; 5 µL de HRP-Strept 1/1000.

### Influencia del tipo de bloqueo

Con el fin de minimizar al máximo la señal correspondiente a adsorciones inespecíficas, se llevaron a cabo diversos estudios relativos al bloqueo de la superficie del electrodo. Aunque todas las optimizaciones anteriores se realizaron utilizando leche como agente bloqueante, a continuación se evaluó el empleo de otros reactivos, así como la concentración requerida y el tiempo de incubación empleado. Como es habitual, se llevaron a cabo medidas comparativas en presencia y en ausencia de APN. En la Figura 107a se muestran los resultados obtenidos empleando como disoluciones de bloqueo leche al 25%, BSA 2% y 2% de caseína en PBS 0.1 M de pH 7.4 durante 30 min. Como puede observarse, la relación superior de respuestas específicas/inespecíficas se logró usando 2% de BSA.

En la Figura 107b se muestra el efecto de la concentración de BSA en la respuesta amperométrica del inmunosensor, observándose una mayor relación de

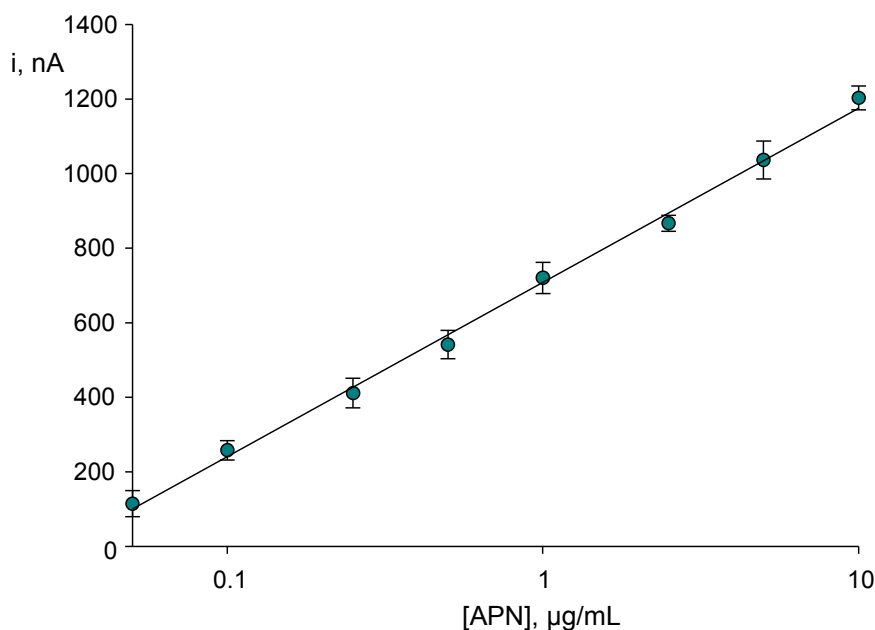
señales específica/inespecífica para un 2% de BSA. Finalmente, se optimizó el tiempo de bloqueo (Figura 107c), siendo 30 min el valor escogido para estudios posteriores.



**Figura 107.** a) Influencia del tipo de bloqueante, b) la concentración de BSA y c) el tiempo de incubación en la disolución de BSA: 3 µL de DWCNT; 3 µL de Mix&Go (60 min); 5 µL de anti-APN 1/75 (60 min); 5 µL de disolución bloqueante; 5 µL de APN 0 ó 1 µg/mL (60 min); 5 µL de biotín-anti-APN 2µg/mL (15 min); 5 µL de HRP-Strept 1/1000 (15 min).

#### 5.3.2.4. Curva de calibrado y características analíticas

Empleando las condiciones experimentales previamente optimizadas, se construyó un calibrado para adiponectina mediante amperometría aplicando un potencial de -200 mV. Como puede observarse en la Figura 108, se obtiene una relación lineal entre la intensidad de corriente y el logaritmo de la concentración de adiponectina entre 0.05 y 10 µg/mL ( $r = 0.998$ ), con una pendiente de  $(467 \pm 10)$  nA, y una ordenada en el origen de  $(708 \pm 8)$  nA. Este intervalo de linealidad, de más de dos órdenes de magnitud, es adecuado para la determinación de APN en muestras biológicas, ya que los niveles esperados en este tipo de muestras son del orden de pocas decenas de µg/mL [Thanakun, 2014].



**Figura 108.** Curva de calibrado obtenida en las condiciones optimizadas para disoluciones estándar de APN con el inmunosensor HRP-Strept/biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE

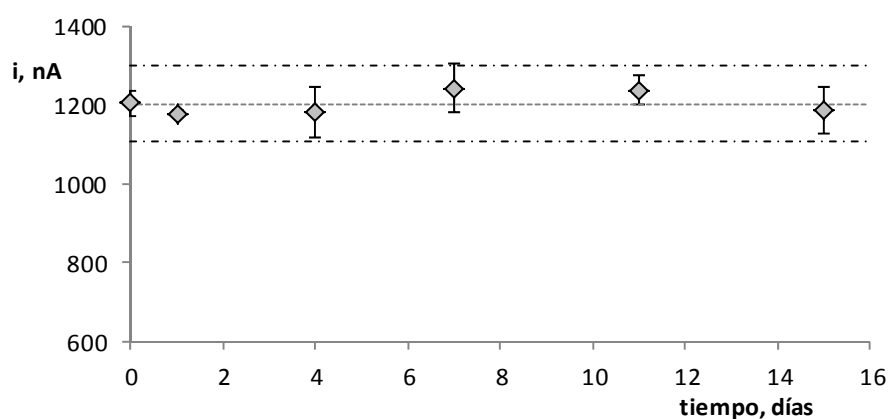
Los límites de detección y de cuantificación se calcularon de acuerdo con el criterio  $3S_b$  y  $10S_b$ , respectivamente, donde  $S_b$  se estimó como la desviación estándar de las respuestas amperométricas obtenidas para las medidas del blanco (en ausencia de APN), siendo este valor en unidades de concentración de  $0.0048 \mu\text{g/mL}$ . Los valores obtenidos fueron  $14$  y  $48 \text{ ng/mL}$ , respectivamente.

#### ***Reproducibilidad y tiempo de vida***

La reproducibilidad de las medidas fue evaluada mediante el cálculo de RSD a partir de las intensidades de corriente medidas con distintos inmunosensores contruidos de la misma forma en el mismo día en ausencia y en presencia de APN ( $1 \mu\text{g/mL}$ ). Los valores de RSD fueron  $6.1$  y  $7.8\%$ , respectivamente. Midiendo con inmunosensores preparados en diferentes días, se obtuvieron valores de RSD de  $6.8$  y  $8.5\%$ , respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto la fiabilidad del proceso de fabricación y la reproducibilidad de la respuesta de los inmunosensores.

También se estudió la estabilidad con el tiempo del inmunosensor anti-APN/DWCNT/SPCE, para lo que se prepararon diferentes SPCEs modificados con el anticuerpo de captura y, tras el bloqueo de la superficie con BSA, se almacenaron en seco a  $-20^\circ\text{C}$ . Para la evaluación de la estabilidad se construyó un gráfico de control

tomando como valor central el valor medio de 3 medidas obtenidas el primer día para una concentración de adiponectina de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fijando los límites superior e inferior en  $\pm 3s$  de este valor de referencia. Como puede observarse (Figura 109), la media de las tres medidas realizadas cada día permanece dentro de dichos límites durante al menos 15 días. Estos resultados demuestran la posibilidad de preparar y almacenar los electrodos modificados anti-APN/DWCNT/SPCE y, realizar la determinación de APN en un tiempo de tan sólo 90 min.



**Figura 109.** Estabilidad de anti-APN/DWCNT/SPCE almacenados en seco a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de adiponectina.

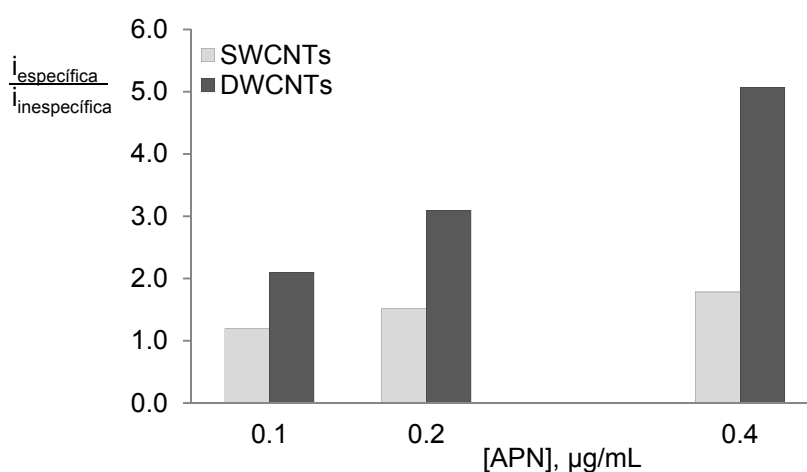
### 5.3.2.5. Respuesta comparativa del inmunosensor sobre electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT/SPCE) y con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs/SPCE)

Se ha considerado de interés comparar las respuestas de inmunosensores construidos con electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono de pared doble con los desarrollados utilizando electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple con un grado análogo de funcionalización. Este grado de funcionalización similar se ha verificado a partir de la relación de picos a partir de la relación de picos  $I_D/I_G$  del espectro Raman, así como de las curvas obtenidas mediante análisis termogravimétrico, TGA [Langa, 2015].

Para ello se prepararon los inmunosensores anti-APN-HOOC-Phe-SWCNTs y anti-APN-HOOC-Phe-SWCNTs siguiendo la misma metodología y se realizaron los inmunoensayos para tres concentraciones diferentes de adiponectina, 0.1, 0.2 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la Figura 110 se comparan los histogramas correspondientes a la relación de

señales específica e inespecífica (en ausencia de APN) para ambos tipos de inmunosensores.

Como se puede observar, cuando se emplean DWCNTs esta relación aumenta considerablemente con la concentración de adiponectina, siendo este aumento mucho menos marcado en el caso de los inmunosensores construidos con SWCNTs. Este hecho implica que se alcanza una sensibilidad notablemente superior para los inmunosensores con DWCNTs que con los que emplean SWCNTs. Este mejor comportamiento electroanalítico del electrodo modificado con DWCNTs puede atribuirse a la estructura única de los nanotubos de carbono de pared doble, que permite la modificación química de la pared exterior, la cual actúa a su vez como una vaina protectora, preservando las propiedades electrónicas de la pared interior [Moore, 2011]. Por otro lado, puesto que la pared interior está “sellada herméticamente” por la pared exterior funcionalizada, las uniones no específicas pueden reducirse significativamente en el caso de los DWCNTs [Huang, 2013].

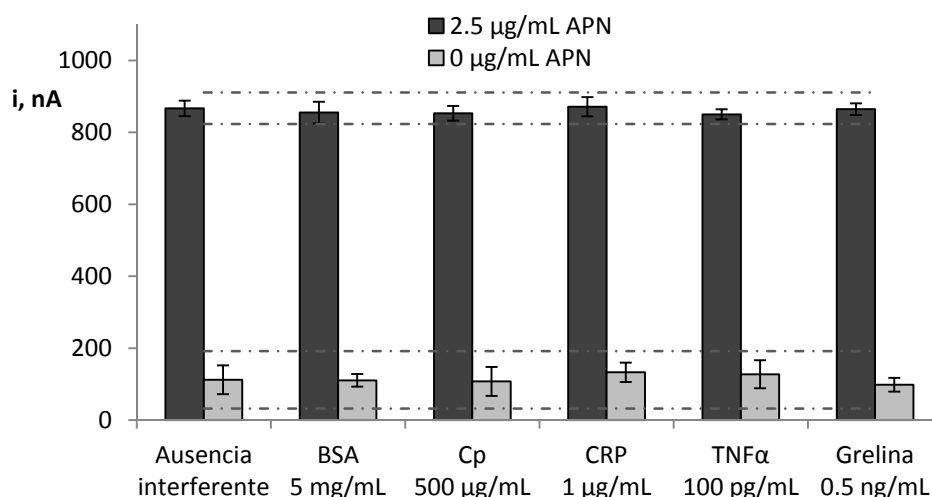


**Figura 110.** Relación de señales específica e inespecífica empleando inmunosensores construidos sobre un electrodo modificado con nanotubos de carbono de pared doble (anti-APN/DWCNT/SPCE) o nanotubos de carbono de pared simple (anti-APN/SWCNTs/SPCE).

### 5.3.2.6. Selectividad del inmunosensor

La selectividad del inmunosensor desarrollado se evaluó frente a diversas proteínas: BSA, ceruloplasmina (Cp), proteína C reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y grelina, que pueden estar presentes en muestras de suero. El estudio se realizó comparando las respuestas amperométricas obtenidas para

inmunosensores en ausencia o en presencia de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de APN y, a su vez, en ausencia y en presencia de cada uno de los compuestos ensayados como interferente a los niveles de concentración que se pueden encontrar en muestras de suero humano. Los resultados, mostrados en la Figura 111, demostraron que ninguna de estas proteínas (a los niveles de concentración ensayados) suponía una interferencia significativa en la determinación de APN demostrando así la alta selectividad de la configuración desarrollada.



**Figura 111.** Selectividad del inmunosensor HRP-Strept/biotin-anti-APN/APN/anti-APN/DWCNT/SPCE. Intensidades de corriente medidas para estándares de 0 (■) ó 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (■) de APN preparados en ausencia o en presencia de interferente.

### 5.3.2.7. Aplicación a la determinación de adiponectina en suero

La utilidad de la inmunosensor para el análisis de muestras reales se demostró mediante el análisis de dos muestras de suero humano correspondientes a pacientes sanos de ambos sexos.

Dado que los niveles normales de adiponectina en suero son del orden de las pocas decenas de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se llevó a cabo una dilución 1:50 de la muestra en PBS 0.1 M de pH 7.4 (menor dilución ensayada a la cual no se observa efecto matriz), tal y como se describe en el apartado 4.5.3.6 de la Parte Experimental,. La determinación de APN empleando el inmunosensor desarrollado se realizó por interpolación de la señal obtenida por la muestra en el calibrado de patrones. Para validar el método se determinó la concentración de APN en las muestras mediante el uso de un kit ELISA comercial. Los resultados obtenidos por ambos métodos (Tabla 35), no muestran

diferencias significativas, lo que pone de manifiesto la utilidad del inmunosensor desarrollado para la determinación de adiponectina en muestras de suero, requiriendo como único pretratamiento una dilución.

Es de destacar el menor tiempo de análisis empleando el inmunosensor desarrollado en este trabajo (90 min) en comparación con la duración del inmunoensayo con el kit ELISA comercial (160 min).

*Tabla 35.- Determinación de adiponectina en suero humano de pacientes sanos.*

Suero	Inmunosensor, $\mu\text{g/mL}$ (n=5)	ELISA, $\mu\text{g/mL}$
Mujer	$7.6 \pm 0.2$	$7.5 \pm 0.5$
Hombre	$10.5 \pm 1.0$	$10.0 \pm 0.6$

Media  $\pm$  ts/ $\sqrt{n}$

### 5.3.2.8. Conclusiones

Se ha descrito por primera vez la preparación y aplicación de un inmunosensor electroquímico para la determinación de APN. El inmunosensor desarrollado se basa en el empleo de electrodos serigrafados de carbono modificados con nanotubos de doble pared (DWCNTs) funcionalizados, conservando sus propiedades eléctricas y mecánicas ya que solo la capa externa es modificada. Por otra parte, el empleo de Mix&Go permite llevar a cabo la activación de la superficie electródica y la inmovilización orientada del anticuerpo anti-adiponectina, lo que facilita la preparación del inmunosensor.

El uso de esta configuración proporciona atractivas características analíticas, presentándose como una alternativa fiable, útil y asequible frente a los métodos descritos hasta el momento para la determinación de adiponectina en muestras de suero.



### **5.3.3. Inmunosensor para fibrinógeno empleando nanocuernos de carbono**

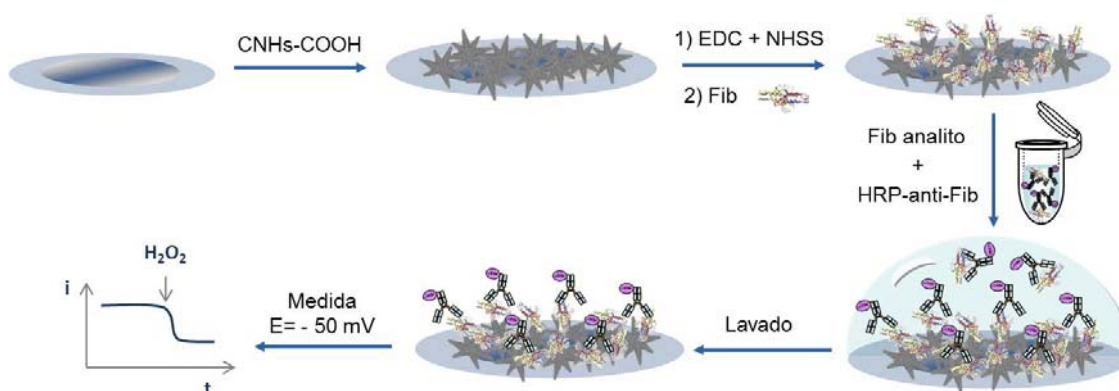
El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un inmunosensor para fibrinógeno empleando como soporte nanocuernos de carbono para la modificación de la superficie electródica. La ventaja de este novedoso nanomaterial viene dada por su estructura cónica que tiende a formar agregados en forma de dalias con una alta concentración de defectos y gran área superficial. Los tratamientos de oxidación conducen a la formación de restos carboxílicos que pueden ser empleados para la unión covalente de biomoléculas.

Este excelente comportamiento ha sido aprovechado para la preparación de un inmunosensor para la determinación de fibrinógeno, proteína de fase aguda positiva, empleada como marcador cardiaco o de síndrome metabólico. Esta configuración implica la modificación de la superficie del electrodo SPCE con el nanomaterial seguido de la inmovilización covalente de fibrinógeno, previa activación de los grupos carboxilos superficiales con el sistema de la carbodiimida.

El dispositivo desarrollado se ha aplicado con éxito a la cuantificación de fibrinógeno en plasma y orina a los niveles fisiológicos que pueden esperarse en muestras clínicas sin prácticamente tratamiento de la muestra.

### 5.3.3.1. Configuración del inmunosensor

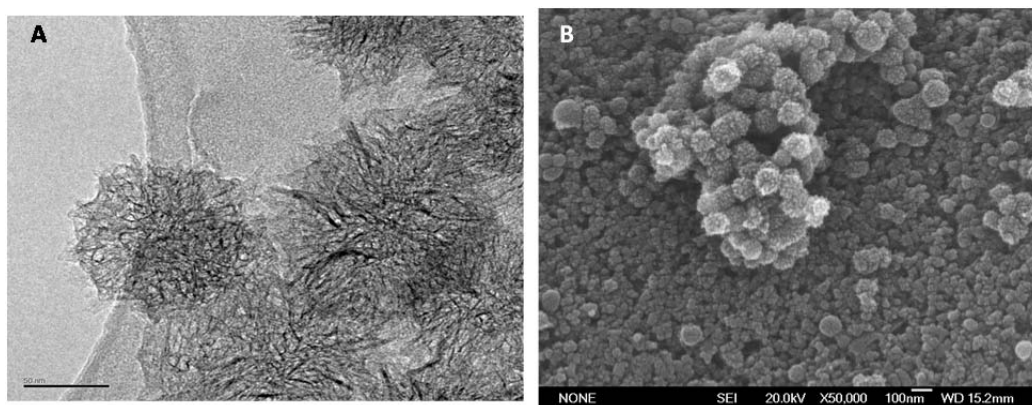
Se ha puesto a punto un inmunosensor amperométrico integrado para la determinación de fibrinógeno en plasma y orina. El inmunosensor emplea electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanocuernos oxidados sobre los que se inmoviliza covalentemente fibrinógeno (ver Figura 112). La cuantificación se logra mediante un ensayo de tipo competitivo indirecto entre el fibrinógeno presente en la muestra y el fibrinógeno inmovilizado en la superficie electródica por los sitios de reconocimiento del anticuerpo marcado con HRP (HRP-anti-Fib). Como en casos anteriores, la detección electroquímica se realiza empleando hidroquinona como mediador redox y  $H_2O_2$  como sustrato enzimático, registrándose la señal amperométrica a  $-0.05$  V.



**Figura 112.** Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE

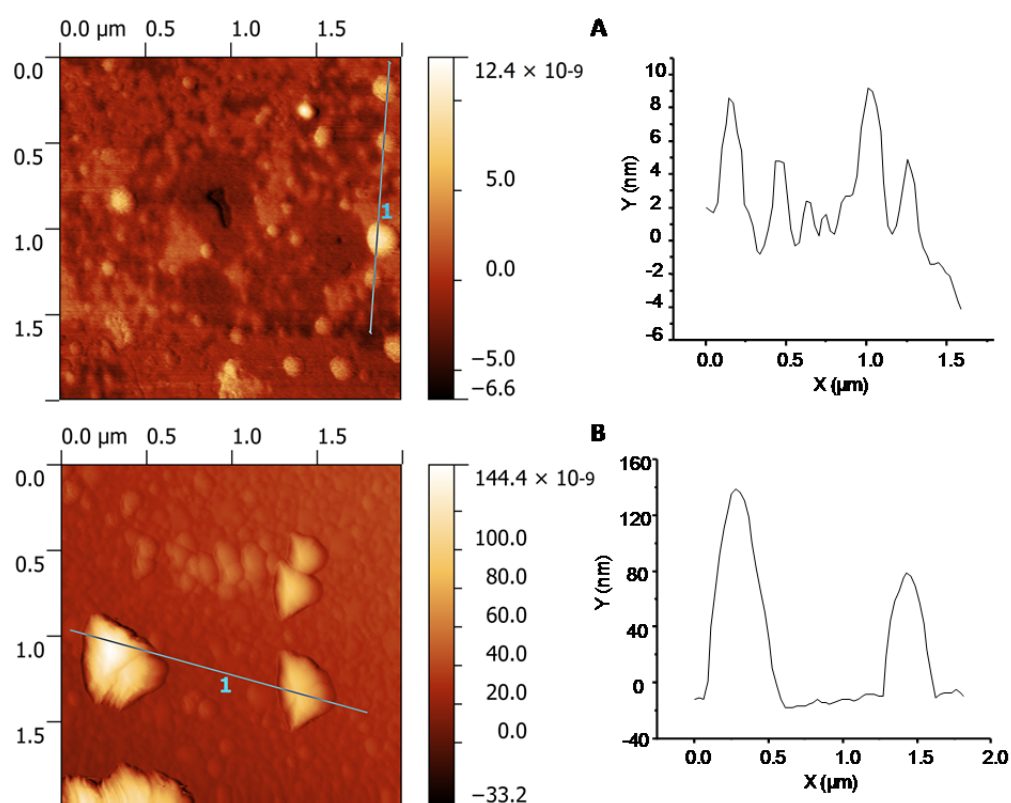
### 5.3.3.2. Caracterización de CNHs y Fib-CNHs

Tanto los CNHs carboxilados, empleados para modificar la superficie del electrodo, como el bioconjugado Fib-CNH fueron caracterizados mediante técnicas microscópicas. En la Figura 113A se muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la que se observan los haces correspondientes a la morfología típica de las dalias, con un diámetro aproximado de 120 nm. Una vez depositados sobre la superficie de los SPCEs, no se modificó su estructura esférica, siendo el diámetro medio de alrededor de 130 nm, tal y como se muestra en la imagen de la Figura 113B obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM), lo que demostró que el proceso de deposición sobre la superficie del electrodo no afecta significativamente a la morfología original de los CNHs.



**Figura 113.** (A) imagen TEM de los CNHs carboxilados (barras de escala, 50nm); (B) imagen SEM de los CNHs depositados sobre SPCE.

Las Figuras 114A y 114B muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) de los CNHs y los bioconjugados Fib-CNH formados por la unión covalente del Fib a los grupos carboxilo presentes en los nanocuernos.

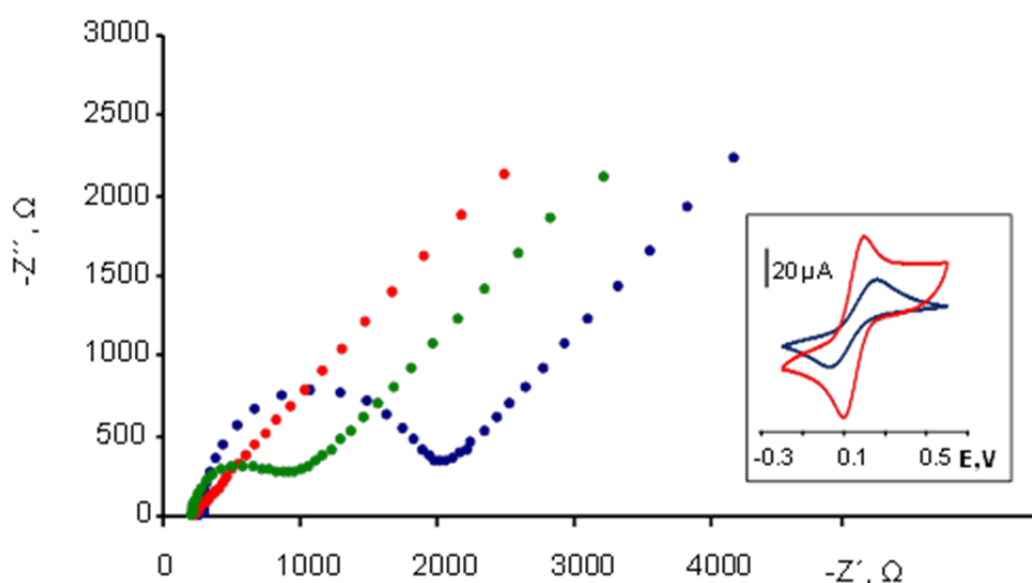


**Figura 114.** Imágenes AMF de los CNHs originales (A) y de los conjugados Fib-CNHs (B).

Como se observa en la Figura 114A, los CNHs altamente dispersos aparecen como pequeñas estructuras esféricas, mientras que los agregados Fib-CNH (Figura

114B) exhiben un tamaño mucho mayor, de unos 450 nm, como resultado de la inmovilización de las biomoléculas.

Las diferentes etapas implicadas en la preparación del inmunosensor Fib/CNH/SPCE se caracterizaron mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). La Figura 115 muestra los diagramas de Nyquist para una disolución de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  1 mM en 0.1 M PBS de pH 7.4 para las etapas de modificación del electrodo: SPCE (azul), CNH/SPCE (rojo) y Fib/CNH/SPCE (verde). Como se esperaba, el electrodo CNH/SPCE exhibió la menor resistencia de transferencia de carga ( $R_{ct} = 80 \Omega$ ), la cual es mucho menor que para el SPCE sin modificar (1680  $\Omega$ ), lo que pone de manifiesto una transferencia de carga más rápida sobre el material modificado con CNHs. Este resultado está de acuerdo con los correspondientes voltamperogramas cíclicos (Figura 115). Por otro lado, como era de esperar, la posterior inmovilización del Fib sobre la superficie electródica modificada, CNH/SPCE, dio como resultado un importante aumento del valor  $R_{ct}$  (800  $\Omega$ ), lo que se puede atribuirse al carácter aislante de la proteína.



**Figura 115.** Diagramas Nyquist registrados para el SPCE (azul), CNH/SPCE (rojo) y Fib/CNH/SPCE (verde) en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4. Recuadro: Voltamperograma cíclico de SPCE (azul) y CNH/SPCE (rojo) en disolución de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  1 mM en PBS 0.1 M de pH 7.4;  $v=50$  mV/s.

### 5.3.3.3. Optimización de las variables experimentales

En los apartados que se describen a continuación se detallan los estudios de optimización de las etapas implicadas en la preparación y funcionamiento del

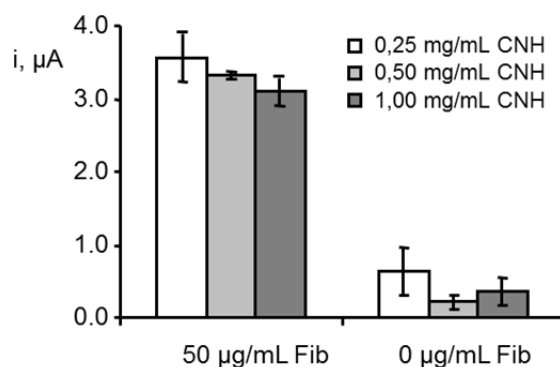
inmunosensor. A modo de resumen, en la Tabla 36 se recogen las variables estudiadas, los intervalos valorados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

*Tabla 36.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE para la determinación de fibrinógeno.*

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
CNHs, mg/mL	0.25 - 1.0	0.5
Fib, $\mu\text{g/mL}$	17.5 - 75	25
agente bloqueante	caseína, BSA, leche	leche
Leche, dilución	1/10 - 1/1	1/4
$t_{\text{bloqueo}}$ , min	15-60	30
HRP-anti-Fib, $\mu\text{g/mL}$	0.25 - 2.0	1.0
$E_{\text{detección}}$ , mV	0 a -200	-50

### ***Influencia de la concentración de CNHs***

En primer lugar se estudió el efecto de la concentración de la disolución de CNHs carboxilados utilizada para modificar la superficie del electrodo de trabajo. Para ello se compararon tres suspensiones acuosas con diferentes concentraciones de CNH 0.25, 0.50 y 1.00 mg/mL. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 116, comparándose en cada caso la respuesta obtenida con el inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE preparado en presencia de 50  $\mu\text{g/mL}$  de fibrinógeno (señales específicas) con las proporcionadas en ausencia de fibrinógeno inmovilizado (señales inespecíficas). Los inmunosensores se prepararon añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de caseína al 2% como agente bloqueante durante 45 min y 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de HRP-anti-Fib 2  $\mu\text{g/mL}$  durante 30 minutos. Todos estos experimentos se realizaron en ausencia de antígeno en la disolución para que evitar que se produzca competición y se obtenga la mayor señal amperométrica posible.



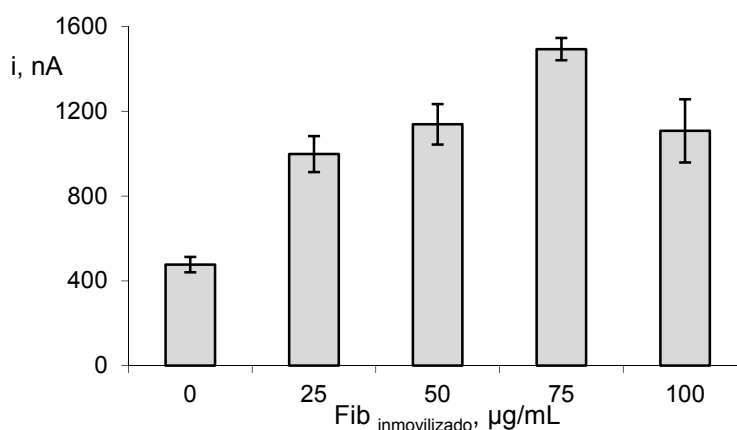
**Figura 116.** Estudio de la influencia de la cantidad de CNH: 10  $\mu\text{L}$  de CNH; 10  $\mu\text{L}$  de Fib 0 ó 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de caseína 2% (45 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (30 min);  $E_{\text{detección}} = -200 \text{ mV}$ .

Como se puede observar en la Figura 116, la corriente en presencia de Fib inmovilizado decrece a medida que aumenta la concentración de CNHs, aunque la tendencia no es del todo clara debido a la variabilidad de las medidas. Esta observación también es válida para las medidas realizadas en ausencia de Fib inmovilizado. Como puede verse en la Figura una concentración de CNHs de 0.5 mg/mL produce la mayor relación entre la respuesta específica e inespecífica y por esta razón, fue la utilizada en los estudios posteriores.

#### ***Influencia de la concentración de Fib inmovilizado***

La concentración de Fib necesaria para saturar los grupos carboxilo activados presentes en la superficie del electrodo se optimizó depositando 10  $\mu\text{L}$  de disoluciones de Fib de diferente concentración, en el intervalo comprendido entre 0 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y dejando hasta sequedad. En esta etapa el Fib se inmoviliza sobre el electrodo modificado tanto por uniones específicas a los grupos carboxilo de los CNHs, como por adsorción. Al igual que en el caso anterior, tras la etapa de bloqueo con caseína, la preparación del inmunosensor requiere la incubación posterior en 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de HRP-anti-Fib de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS de pH 7.4 en ausencia de antígeno durante 30 minutos.

La Figura 117 muestra como la corriente medida aumenta con la concentración de fibrinógeno inmovilizado hasta 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyendo para concentraciones superiores a este valor. Estos resultados indican que esta concentración es suficiente para saturar los grupos carboxilo activados sobre CNH/SPCE, y por este motivo se elige para los estudios posteriores.

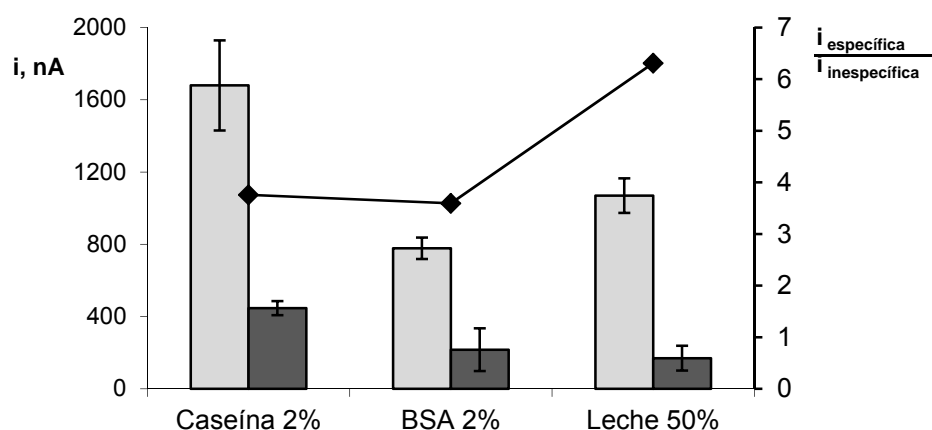


**Figura 117.** Influencia de la concentración de Fib inmovilizado: 10  $\mu\text{L}$  de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu\text{L}$  de Fib; 10  $\mu\text{L}$  de caseína 2% (45 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib 0.5 $\mu\text{g/mL}$  (30 min);  $E_{\text{detección}} = -200$  mV.

### ***Influencia de la etapa de bloqueo***

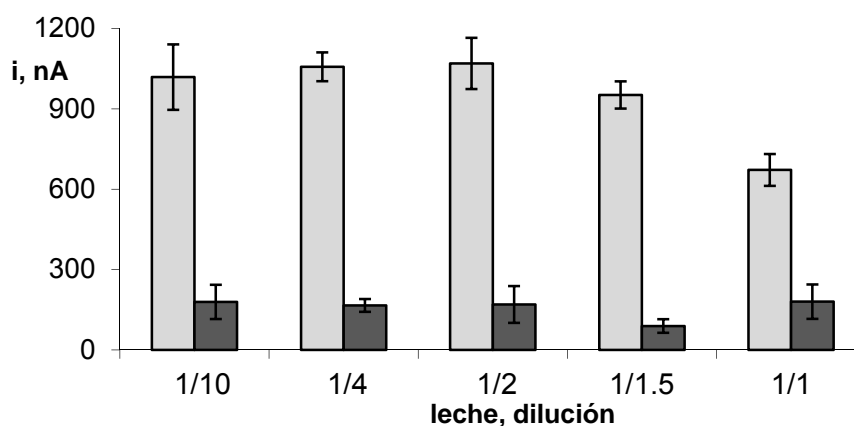
Con el fin de evitar o minimizar las adsorciones inespecíficas de los inmunorreactivos sobre la superficie de electrodo, se llevaron a cabo varios estudios que conllevan el bloqueo de los sitios reactivos que han quedado sin modificar en la superficie del electrodo. Para esto se estudió la naturaleza del agente bloqueante, su concentración y el tiempo de incubación.

Para escoger el tipo de bloqueante, se compararon las respuestas analíticas obtenidas utilizando tres agentes bloqueantes de uso común en la preparación de inmunosensores electroquímicos, caseína al 2%, BSA al 2% y leche semidesnatada al 50%, todos ellos preparados en PBS 0.1M de pH 7.4. Para las medidas se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de cada disolución bloqueante sobre el CNH/SPCE o sobre el Fib-CNH/SPCE y se dejó durante un periodo de incubación de 45 min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 118. Aunque la caseína proporciona una mayor respuesta específica, se obtiene una mejor relación entre la señal específica e inespecífica empleando leche (igual a 6.4 frente a 3.8 cuando se emplea caseína o BSA).



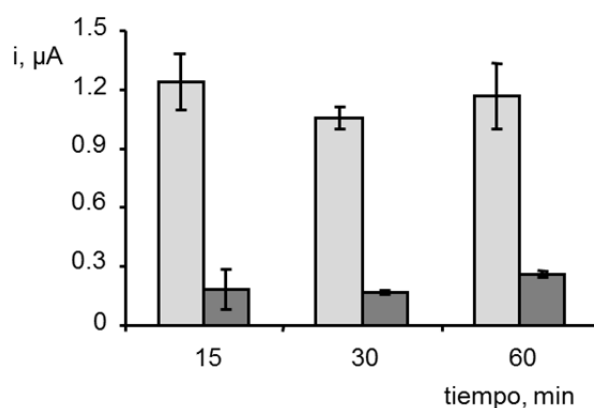
**Figura 118.** Influencia del tipo de bloqueante: a) 10  $\mu$ L de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu$ L de Fib 0 (■) ó 75  $\mu$ g/mL (□); 10  $\mu$ L de bloqueante (45 min); 10  $\mu$ L de HRP-anti-Fib 0.5 $\mu$ g/mL (30 min);  $E_{\text{detec.}}=-200$  mV.

Una vez elegido el bloqueante, se estudió la dilución óptima de leche, obteniéndose los resultados representados en la Figura 119. Como puede observarse, no hay diferencias significativas en las señales obtenidas en presencia de 75  $\mu$ g/mL de fibrinógeno, así como en las obtenidas en ausencia de fibrinógeno inmovilizado para diluciones comprendidas entre 1/10 y 1/1.5 en medio PBS, aunque la respuesta específica es ligeramente superior y la inespecífica algo inferior para una dilución 1/4.



**Figura 119.** Influencia de la dilución de leche: 10  $\mu$ L de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu$ L de Fib 0 (■) ó 75  $\mu$ g/mL (□); 10  $\mu$ L de leche (45 min); 10  $\mu$ L de HRP-anti-Fib 0.5 $\mu$ g/mL (30 min);  $E_{\text{detec.}}=-200$  mV.

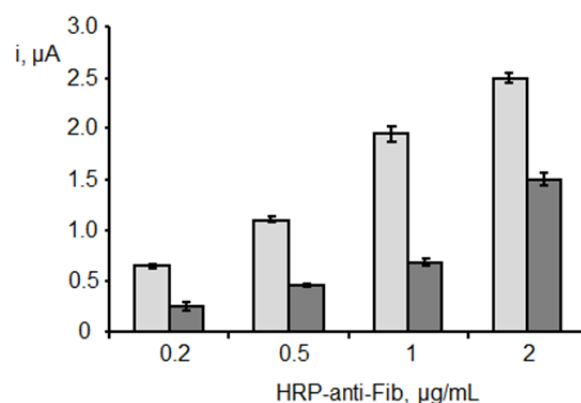
Finalmente, se optimizó el tiempo de bloqueo, mostrándose los resultados de este estudio en la Figura 120. Como puede observarse, la relación entre las respuestas específicas e inespecíficas fue similar en todo el intervalo de tiempo estudiado por lo que se seleccionó 30 minutos como el valor óptimo ya que es el que presenta mayor reproducibilidad de las medidas.



**Figura 120.** Tiempo de incubación de bloqueo: 10  $\mu\text{L}$  de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu\text{L}$  de Fib 0 (■) ó 75  $\mu\text{g/mL}$  (□); 10  $\mu\text{L}$  de leche 1/4; 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (30 min);  $E_{\text{detección}} = -200$  mV.

### ***Efecto de la concentración de HRP-anti-Fib***

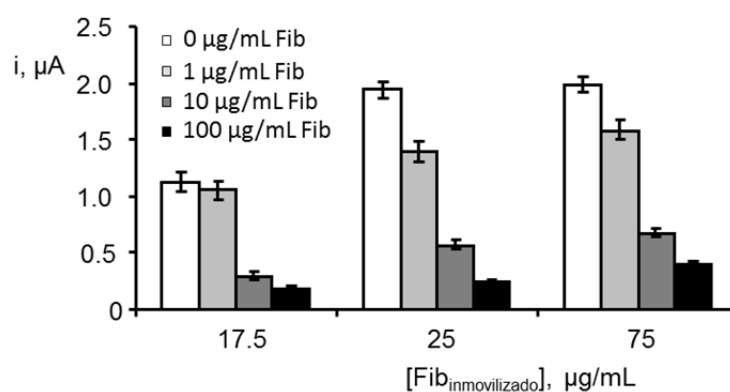
La concentración de HRP-anti-Fib usada en el ensayo competitivo indirecto se optimizó comparando las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE en presencia y en ausencia de Fib analito. Para realizar este estudio, tras el bloqueo de la superficie electródica, se incubó durante 30 min el electrodo modificado, Fib/CNH/SPCE, con 10  $\mu\text{L}$  de disoluciones que contienen 0 ó 10  $\mu\text{g/mL}$  de Fib analito, y HRP-anti-Fib en el intervalo de 0.2 a 2  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 121).



**Figura 121.** Influencia de la concentración de anticuerpo marcado: 10  $\mu\text{L}$  de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu\text{L}$  de Fib 75  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de leche 1/4 (30 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib en presencia de 0 (□) ó 10  $\mu\text{g/mL}$  (■) de Fib analito (30 min);  $E_{\text{detección}} = -200$  mV.

Como puede observarse, la mayor diferencia entre la corriente medida en presencia y ausencia de Fib analito se observó para 1  $\mu\text{g/mL}$  de HRP-anti-Fib y por ello se seleccionó este valor como más adecuado. Sin embargo, la respuesta obtenida en ausencia de Fib analito se incrementa a medida que lo hace la concentración de HRP-anti-Fib como consecuencia de la mayor concentración de enzima sobre la superficie

del electrodo. Este comportamiento sugiere que las posiciones de enlace del Fib inmovilizado no están saturadas en este Intervalo de concentración. Por esta razón se realizó un nuevo estudio de la influencia de la concentración de Fib inmovilizado empleando 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del anticuerpo marcado. Para ello se prepararon diferentes inmunosensores inmovilizando sobre el electrodo 17.5, 25 y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fibrinógeno y empleando diferentes concentraciones de Fib analito (0, 1, 10 o 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de HRP-anti-Fib. Los resultados de la Figura 122 mostraron que la mayor sensibilidad se obtiene inmovilizando 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fibrinógeno, ya que en estas condiciones se obtuvieron mayores diferencias de corriente para las concentraciones más bajas de analito, lo que posibilita la obtención de un menor límite de detección y de una curva de calibrado lineal en un amplio Intervalo de concentraciones.



**Figura 122.** Influencia de la concentración de fibrinógeno inmovilizado: 10  $\mu\text{L}$  de CNH 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de Fib; 10  $\mu\text{L}$  leche 1/4, 30 min; 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en presencia de 0, 1, 10 ó 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fib analito, 30 min;  $E_{\text{detección}} = -200 \text{ mV}$ .

### ***Optimización del tiempo de competición***

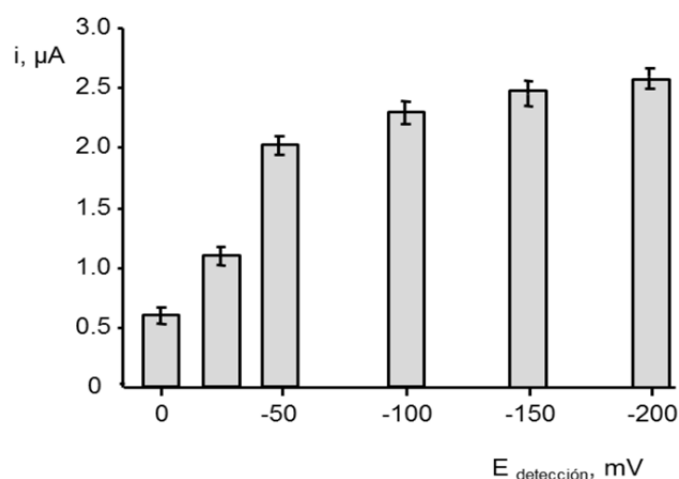
La preparación del inmunosensor requiere una etapa de incubación de la superficie electródica modificada Fib/CNH/SPCE en una disolución mezcla del anticuerpo y fibrinógeno analito, estableciéndose una competición entre el fibrinógeno inmovilizado y el fibrinógeno analito en disolución por los sitios de unión del anticuerpo.

En primer lugar se estudió la necesidad o no de incluir un tiempo de contacto entre el anti-Fib y el Fib analito. Para ello, se preparó una disolución mezcla de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de HRP-anti-Fib y 0 ó 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fib y se mantuvo agitando en un tubo eppendorf durante 30 min a 25°C. Seguidamente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la disolución de reacción sobre el Fib/CNH/SPCE dejando incubar durante 30 min más. Alternativamente, se

adicionaron sobre el electrodo modificado 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla recién preparada, suprimiendo la preincubación, y se dejó 30 minutos. No se obtuvieron diferencias significativas tras aplicar ambos procedimientos por lo que, en estudios posteriores se adiciona la disolución mezcla de ambos reactivos recién preparada sobre el electrodo modificado sin realizar una incubación previa en disolución.

### ***Efecto del valor del potencial de detección***

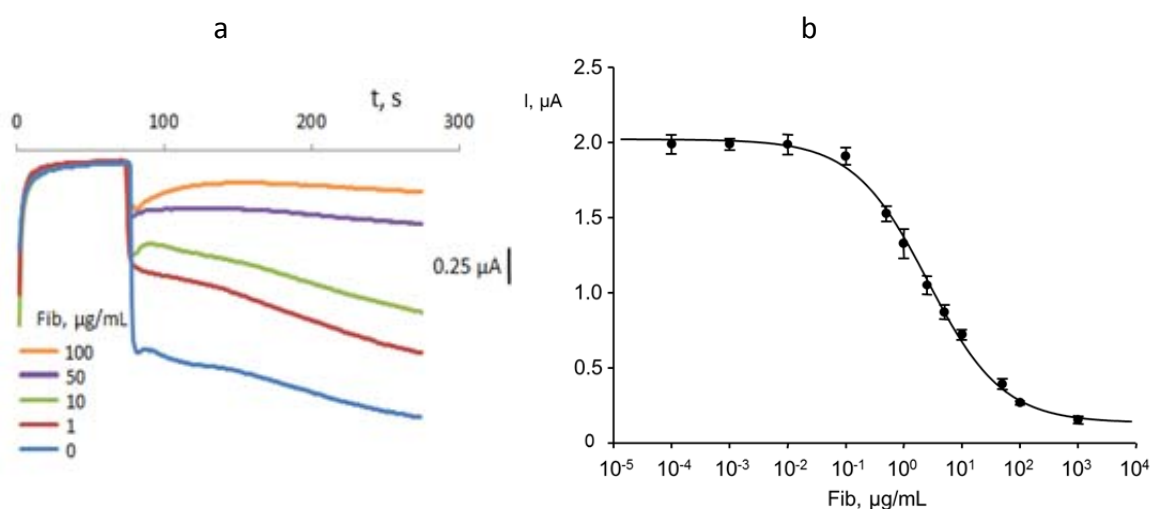
Para elegir el potencial de detección, se investigó la influencia de dicha variable sobre la corriente obtenida tras 200 segundos después de la adición de 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE. En la Figura 123 se muestran los valores obtenidos en función del potencial aplicado en el intervalo de 0 a -200 mV. Como puede apreciarse, la respuesta aumenta drásticamente desde 0 hasta -50 mV, a partir de dicho potencial el incremento de señal presenta una tendencia más suave. El mismo estudio realizado en el inmunosensor del estradiol, dio lugar a un aumento de corriente a medida que el potencial se hace más negativo hasta un valor de -0.20 V, a partir del cual se estabiliza la señal. Estas diferencias pueden deberse a la existencia de un efecto catalítico por parte de los nanocuernos de carbono inmovilizados sobre el electrodo serigrafiado de carbono. Como solución de compromiso entre una buena sensibilidad y un reducido potencial de detección se escogió un valor de -50 mV para estudios posteriores.



**Figura 123.** Estudio de la influencia del potencial de detección: 10  $\mu\text{L}$  de CNH 0.5 mg/mL; 10  $\mu\text{L}$  de Fib 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de leche 1/4 (30 min); 10  $\mu\text{L}$  de HRP-anti-Fib 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (30 min).

### 5.3.3.4. Curva de calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente, se obtuvo una curva de calibrado para fibrinógeno en el intervalo comprendido entre 0.0001 y 10000  $\mu\text{g/mL}$  de fibrinógeno. A modo de ejemplo, en la Figura 124a se recogen algunos de los amperogramas registrados para diferentes concentraciones de fibrinógeno. La curva de calibrado obtenida aparece representada en la Figura 124b.



**Figura 124.** a) Amperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de fibrinógeno y b) Calibrado obtenido con el inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE

Como era de esperar, el calibrado presenta el hábito típico del formato competitivo, es decir, un incremento de la concentración de Fib analito disminuye la posibilidad de que el anticuerpo se enlace al Fib inmovilizado en la superficie del electrodo, dando lugar a un descenso en la señal de corriente. Las barras de error se obtuvieron a partir de las medidas realizadas con tres inmunosensores diferentes en cada caso. La curva de la corriente frente a la concentración de Fib se ajustó a una regresión sigmoideal, siendo la ecuación obtenida ( $R^2 = 0.998$ ):

$$y = \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{\left(1 + \frac{EC_{50}}{x}\right)^h} + i_{m\acute{i}n}$$

donde  $i_{m\acute{a}x} = (2.02 \pm 0.03) \mu\text{A}$  es el valor máximo de la corriente, obtenida en ausencia de analito, e  $i_{m\acute{i}n} = (0.13 \pm 0.04) \mu\text{A}$  es la corriente mínima que corresponde a la señal obtenida en exceso de analito. La pendiente de Hill,  $h$ , fue  $0.66 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$  y el valor de  $EC_{50}$  de  $2.5 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ .

La curva muestra una relación lineal entre la respuesta amperométrica y el logaritmo de la concentración de Fib entre 0.1 y 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $r = 0.994$ ), con una pendiente de  $-(0.56 \pm 0.02) \mu\text{A}$ , y una ordenada de  $(1.32 \pm 0.02) \mu\text{A}$ . El límite de detección, 58  $\text{ng/mL}$ , se calculó utilizando la ecuación:

$$LD = EC_{50} \left( \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

donde  $s$  es la desviación estándar del valor de la corriente obtenida en ausencia de Fib analito (46 nA).

A modo de resumen en la siguiente tabla se muestran las características analíticas obtenidas para el inmunosensor de fibrinógeno.

*Tabla 37.- Características analíticas del inmunosensor HRP-anti-Fib/Fib/CNH/SPCE para la determinación de fibrinógeno.*

Ecuación	$y = \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{\left(1 + \frac{EC_{50}}{x}\right)^h} + i_{m\acute{i}n}$
Intervalo lineal, $\mu\text{g/mL}$	0.2-100 $r = 0.998$
$EC_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$	$2.5 \pm 0.3$
Constante de Hill	$0.66 \pm 0.05$
Mínimo, $\mu\text{A}$	$0.13 \pm 0.04$
Máximo, $\mu\text{A}$	$2.02 \pm 0.03$
LD, $\text{ng/mL}$	58
$s$ , punto en ausencia de fibrinógeno, $n=8$	46
$r$	0.998

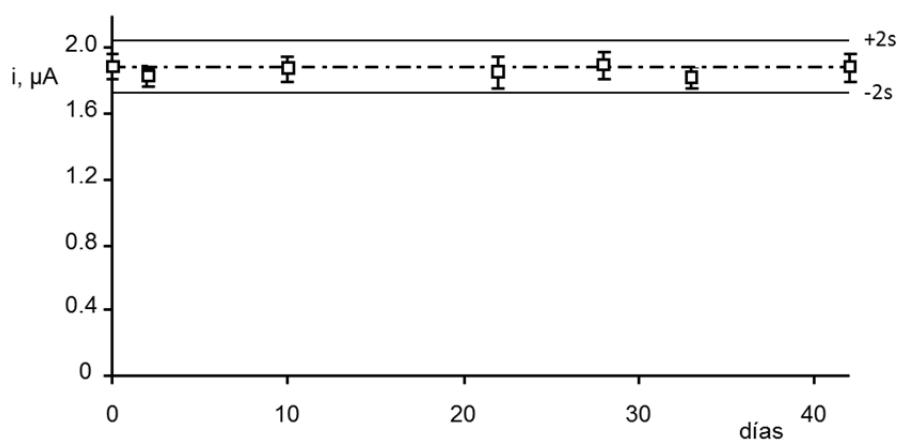
$$LD = \left( \frac{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n}}{i_{m\acute{a}x} - i_{m\acute{i}n} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

### **Reproducibilidad y tiempo de vida**

Como ya se ha mencionado anteriormente, los inmunosensores basados en el empleo de SPEs suelen ser desechables, lo que supone el uso de un electrodo nuevo para cada medida. Como consecuencia, la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes inmunosensores fabricados de la misma manera es un aspecto esencial a considerar para asegurar la utilidad práctica real del diseño.

Atendiendo a esto, en primer lugar se evaluó la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de  $2.5 \mu\text{g/mL}$  de fibrinógeno, siendo esta concentración el valor del punto de inflexión de la curva, por lo que cabe esperar que sea el que presente la mayor variabilidad en la medida. Este estudio se realizó con distintos inmunosensores ( $n = 8$ ) contruidos de la misma forma en el mismo día, obteniéndose valores de RSD de 3.8 y 6.9%, respectivamente, mientras que para las medidas efectuadas en diferentes días se obtuvieron valores de RSD ( $n = 8$ ) de 6.7 y 7.3%, respectivamente. Estos valores ponen de manifiesto la buena precisión de las medidas y la fiabilidad del método de fabricación del inmunosensor.

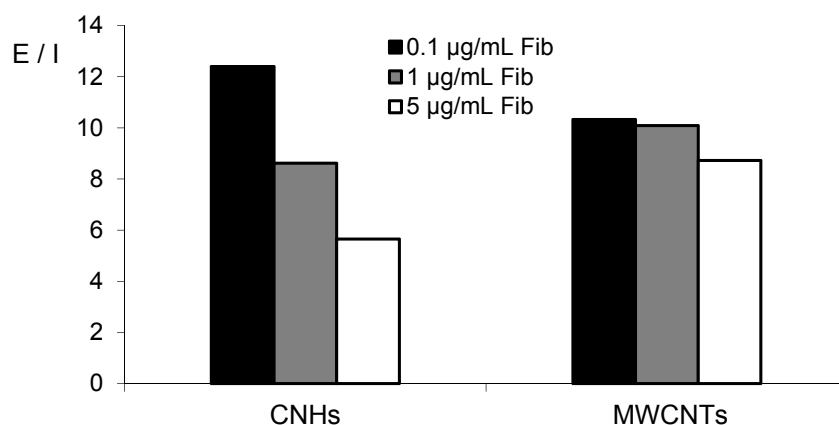
Por otro lado, también se evaluó el tiempo de vida útil de los electrodos modificados con fibrinógeno, conservando los electrodos Fib/CNH/SPCE, preparados el mismo día bajo condiciones de sequedad a  $-20^\circ\text{C}$ . Los gráficos de control del tiempo de vida útil se construyeron estableciendo como valor de referencia el valor medio de las medidas amperométricas ( $n = 3$ ) registradas en ausencia de analito, el primer día de estudio, y como límites superior e inferior los valores correspondientes al doble de la desviación estándar de estas medidas. Las respuestas amperométricas obtenidas permanecieron dentro de los límites de control durante al menos 42 días, sin pérdida apreciable de la sensibilidad original en este periodo de estudio (Figura 125), lo que indica una excelente estabilidad de almacenaje del Fib/CNH/SPCE, y demuestra la posibilidad de su preparación y almacenamiento bajo las condiciones especificadas anteriormente.



**Figura 125.** Estabilidad de Fib/CNH/SPCE almacenados en seco a  $-20^\circ\text{C}$ . Las señales corresponden a la media de tres medidas sucesivas en ausencia de Fib analito

### 5.3.3.5. Respuesta comparativa del inmunosensor sobre electrodos modificados con nanocuernos de carbono (CNHs/SPCE) y con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs/SPCE)

A continuación se realiza un estudio comparativo de la respuesta del inmunosensor desarrollado sobre electrodos serigrafiados modificados con nanocuernos de carbono carboxilados con la proporcionada empleando electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados disponibles comercialmente. Para ello, se inmovilizó el fibrinógeno sobre ambas superficies electrónicas y se realizó el inmunoensayo para tres concentraciones diferentes de fibrinógeno analito, 0.1, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La señal inespecífica se obtiene en ausencia de fibrinógeno inmovilizado. En la Figura 126 se muestra las señales de corriente obtenidas para las tres concentraciones de fibrinógeno sobre ambas superficies electrónicas. Como puede observarse, cuando se emplean CNHs las respuestas obtenidas son claramente diferentes para las tres concentraciones de fibrinógeno, a diferencia de lo observado para el mismo intervalo de concentración cuando se utilizó la superficie modificada con nanotubos de carbono.



**Figura 126.** Relación de señales específica e inespecífica empleando inmunosensores construidos sobre un electrodo modificado con nanocuernos (Fib/CNH/SPCEs) o nanotubos de carbono (Fib/MWCNTs/SPCE)

Estos resultados permiten obtener un menor límite de detección sobre el electrodo modificado con nanocuernos de carbono. Así, el límite de detección obtenido empleando los electrodos SPCE modificados con MWCNTs es de 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo aproximadamente 100 veces superior al alcanzado con el inmunosensor desarrollado usando los nanocuernos de carbono. Además, se obtiene un valor de  $\text{EC}_{50}$

un orden de magnitud superior (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que pone de manifiesto que la plataforma basada en el uso de los CNHs proporciona una mayor sensibilidad y un intervalo lineal más amplio que cuando el electrodo se modifica con los MWCNTs.

La diferencia de comportamiento entre ambas superficies se explica teniendo en cuenta el procedimiento empleado en la síntesis de los nanocuernos de carbono, obtenidos mediante ablación de grafito con láser de  $\text{CO}_2$  en ausencia de catalizadores metálicos en atmósfera de argón a temperatura ambiente, lo que le confiere una pureza mucho mayor que la de los nanotubos de carbono. Además la funcionalización de los nanocuernos implica un tratamiento oxidativo suave, con peróxido de hidrógeno, durante un corto periodo de tiempo, que introduce grupos carboxílicos en los extremos de los conos de los agregados tipo dalia, evitando su acortamiento y generando cantidades mínimas de productos carbonosos [Pagona, 2006]. Este procedimiento se diferencia del proceso de funcionalización aplicado comúnmente a los CNTs, que implica el empleo de ácidos fuertes a reflujo y ultrasonidos durante largos periodos de tiempo, causando la división de los nanotubos originales en trozos más pequeños.

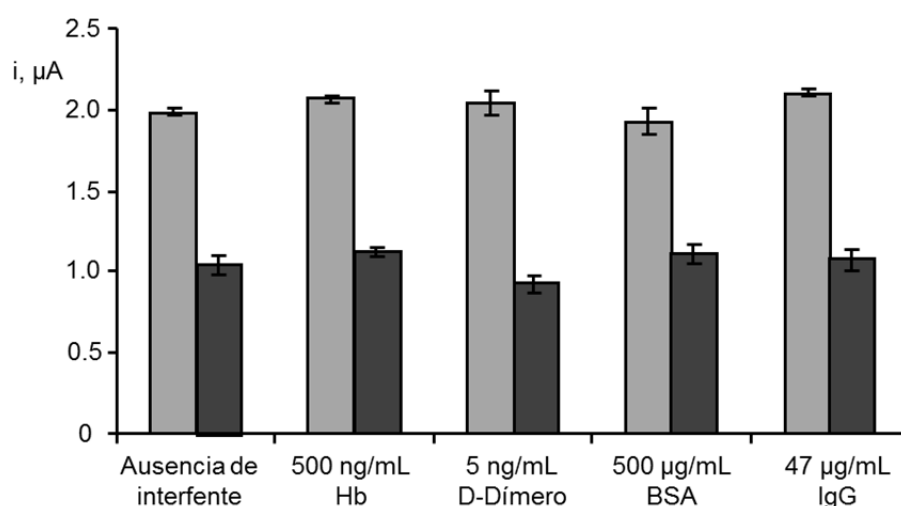
### 5.3.3.6. Selectividad del inmunosensor

Para evaluar la selectividad del inmunosensor frente al fibrinógeno, se ensayaron otras proteínas no específicas (hemoglobina (Hb), D-dímero, BSA e IgG) presentes en las muestras analizadas. Este estudio se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas para 0 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fib (valor de  $\text{EC}_{50}$ ), en ausencia y en presencia de cada uno de los compuestos testados.

Hay que mencionar que la determinación de fibrinógeno en plasma a niveles fisiológicos normales (1.5 - 4.5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) requiere una previa dilución de la muestra para que dichos valores estén incluidos dentro del intervalo lineal de la curva de calibrado. Por esta razón, se estudió la influencia de la presencia de hemoglobina, BSA e IgG en concentraciones de 500, 500 y 47  $\text{ng}/\text{mL}$ , respectivamente, que se corresponden con los valores más elevados, dentro de los niveles fisiológicos normales en muestras de plasma, tras realizar una dilución previa 1:100 de la misma.

En el caso del D-dímero, se evaluó la influencia de su presencia en la señal del inmunosensor a una concentración 6 veces más alta que la esperada para individuos sanos, ya que debido a la similitud en la secuencia de aminoácidos entre esta proteína y el fibrinógeno [Wang, 2012], es de esperar que sea la especie que mayor interferencia podría presentar.

Como puede observarse en la Figura 127, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de interferente, lo que ponen de manifiesto la inexistencia de reactividad cruzada, y por tanto, permite afirmar que ninguna de las sustancias investigadas interfiere de forma significativa en la respuesta del inmunosensor.



**Figura 127.** Estudio de reactividad cruzada. Señales amperométricas obtenidas para 0 (■) y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de Fib (■), en ausencia y en presencia de 500 ng/mL de Hb, 500 de BSA ó 47 de IgG.

### 5.3.3.7. Aplicación a la determinación de fibrinógeno en plasma y orina

El inmunosensor desarrollado se aplicó a la determinación en un patrón de plasma certificado que contiene una concentración de fibrinógeno de 2.7 mg/mL. Además, también se analizaron muestras de orina enriquecidas a los niveles de concentración fisiológicos de 0.65, 5 y 25  $\mu\text{g/mL}$  de Fib.

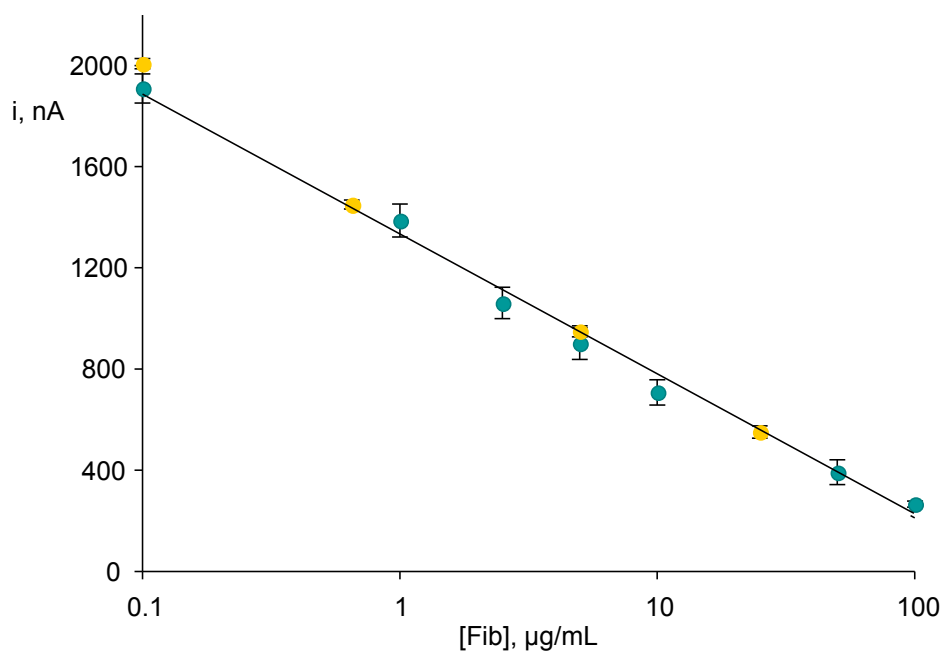
#### *Plasma humano certificado*

La posible existencia de efecto matriz se investigó por comparación de los valores de las pendientes de la gráfica de calibrado construida con disoluciones estándar de fibrinógeno en el intervalo comprendido entre 0.1 y 100  $\mu\text{g/mL}$  y la

construida a partir de diferentes diluciones de la muestra de plasma. La ecuación de regresión obtenida para el plasma  $i, \mu A = -(0.58 \pm 0.01) \log ([Fib], \mu g/mL) + 1.35 \pm 0.01$  revela que no existen diferencias significativas para un nivel de significación de 0.05 entre este valor de la pendiente y la obtenida con disoluciones estándar de Fib ( $-0.56 \pm 0.02$ )  $\mu A$ . Estos resultados indican que la determinación de Fib en plasma puede llevarse a cabo por interpolación directa de los valores de corriente obtenidas para la muestra en el calibrado de patrones y posterior aplicación del factor de dilución aplicado a la muestra. De esta forma se obtuvo una concentración media de Fib de  $2.7 \pm 0.2$  mg/mL, siendo el valor de RSD de 7.4% (n=8), lo que corresponde a una recuperación media del  $99 \pm 7\%$ .

### ***Orina***

La muestra de orina se analiza, tras el ajuste del pH inicial de 5 a 7.4 por adición de sales de fosfato potásico a las muestras enriquecidas, sin necesidad de realizar una dilución previa. Al igual que en casos anteriores, se comprueba la ausencia de efecto matriz por comparación estadística de las pendientes del calibrado obtenido para la muestra de orina ( $i, \mu A = -(0.57 \pm 0.01) \log ([Fib], \mu g/mL) + 1.34 \pm 0.01$ ) y del correspondiente a disoluciones estándar de fibrinógeno. Las concentraciones medias de Fib obtenidas por interpolación en el calibrado externo para las muestras enriquecidas fueron  $0.65 \pm 0.05$ ,  $4.9 \pm 0.04$  y  $24 \pm 0.02$   $\mu g/mL$ , que corresponden a recuperaciones comprendidas entre  $98 \pm 8$  y  $100 \pm 7\%$ . Con fines comparativos, en la Figura 128 se representa el calibrado para la muestra de orina enriquecida a los niveles de concentración arriba indicados (puntos amarillos) con el tramo recto del calibrado de patrones de Fib, encontrándose un ajuste perfecto entre ambos.



**Figura 128.** Señales obtenidas para la muestra de orina enriquecida (●) superpuestas al intervalo recto obtenido para los patrones de fibrinógeno (●).

Los resultados anteriormente expuestos ponen de manifiesto la utilidad del inmunosensor desarrollado para el análisis de Fib en plasma humano y en orina a niveles de concentración que pueden esperarse en las muestras clínicas.

### 5.3.3.8. Conclusiones

La estructura única y la alta pureza de los CNHs producen una gran cantidad de grupos oxigenados tras un proceso de oxidación suave con  $H_2O_2$  que pueden ser empleados para la inmovilización de biomoléculas. Este comportamiento ha sido ilustrado mediante la preparación de un inmunosensor amperométrico desechable para la determinación de fibrinógeno que exhibe excelentes características analíticas en términos de sensibilidad, selectividad, reproducibilidad de las medidas y estabilidad de almacenamiento, generalmente mejores a la de otros inmunosensores de fibrinógeno y kits ELISA comerciales.

Finalmente, el inmunosensor desarrollado, Fib/CNH/SPCE, se ha aplicado con éxito a la cuantificación rápida y precisa de fibrinógeno en plasma humano y orina a los niveles que pueden esperarse en muestras clínicas sin prácticamente tratamiento de la muestra.



## **6. CONCLUSIONES**

---





A lo largo de la memoria se han ido exponiendo conclusiones al trabajo presentado en los distintos capítulos, en las que se han resaltado los hitos alcanzados y se han comparado las configuraciones desarrolladas con las de otros biosensores, en caso de existir, o con otras metodologías utilizadas previamente. De un modo general, puede decirse que a través de las investigaciones realizadas, se han explorado las posibilidades electroanalíticas del empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas y de diferentes nanomateriales de carbono, así como de técnicas de inmovilización novedosas, con el fin de poner a punto dispositivos analíticos y métodos de determinación de marcadores de la obesidad competitivos con los procedimientos existentes. Debe destacarse la preparación de los primeros inmunosensores electroquímicos existentes para ceruloplasmina y adiponectina.

Además, como se ha señalado en cada caso, las características analíticas de la mayoría de los métodos puestos a punto en esta Tesis Doctoral, mejoran las de los procedimientos previos, principalmente en términos de sensibilidad, intervalo de linealidad y reproducibilidad, o bien disminuyen considerablemente el tiempo de ensayo.

Todos los resultados obtenidos demuestran la utilidad analítica y la versatilidad de los inmunosensores desarrollados. Los valores de las desviaciones estándar relativas para la reproducibilidad entre distintos inmunosensores han resultado ser en todos los casos inferiores al 10%, lo que demuestra la fiabilidad del proceso de fabricación de cada uno de los dispositivos.

Finalmente, todos los inmunosensores han demostrado su utilidad práctica por aplicación a muestras biológicas para la determinación de los analitos estudiados a niveles fisiológicos, tales como suero, leche materna, plasma, saliva y orina con buenos resultados.

En resumen, el corto tiempo de análisis requerido, la simplicidad de los procedimientos experimentales involucrados, y la fácil automatización y miniaturización de la instrumentación empleada hacen de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas y de las metodologías implementadas herramientas analíticas útiles, prometedoras y atractivas para el desarrollo de dispositivos portátiles de fácil uso para el análisis in situ.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---





## Q

[Agüí, 2008]: L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón (2008) Role of Carbon Nanotubes in Electroanalytical Chemistry: a Review; *Anal. Chim. Acta*; 622: 11-47.

[Aizawa, 2004]: H. Aizawa, S. Kurosawa, M. Tozuka, J.W. Park, K. Kobayashi (2004) Rapid Detection of Fibrinogen and Fibrin Degradation Products Using a Smart QCM-Sensor; *Sensor Actuator B Chem*; 101: 150-154.

[Al-Khafaji, 2012]: Q.A.M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A.P.F. Turner, M. Mascini, G. Marrazza (2012) An Electrochemical Immunoassay for HER2 Detection; *Electroanal.*; 24: 735-742.

[Álvarez-Castro, 2011]: P. Álvarez-Castro, S. Sangiao-Alvarellos, I. Brandón-Sandá y F. Cordido (2011) Función Endocrina en la Obesidad; *Endocrinol Nutr.*; 58: 422-432.

[Anik, 2009]: Ü. Anik, S. Çevik (2009) Double-Walled Carbon Nanotube Based Carbon Paste Electrode as Xanthine Biosensor; *Microchim Acta*; 166: 209-213.

[Antibodies, 1988]: *Antibodies: A Laboratory Manual* (Eds: E. Harlow, D. Lane), Cold Spring Harbor, New York 1988.

[Arita, 1999]: Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, Y. Matsuzawa (1999) Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity; *Biochem Biophys Res Commun*; 257: 79-83.

[Athey, 1995]: D. Athey, M. Ball, C.J. McNeil, R.D. Armstrong (1995) A Study of Enzyme-Catalyzed Product Deposition on Planar Gold Electrodes Using Electrical Impedance Measurement; *Electroanalysis*, 7: 270-273.

## B

[Bastard, 2002]: J. Bastard, M. Maachi, J. Tran van Nhieu, C. Jardel, E. Bruckert, A. Grimaldi, J. Robert, J. Capeau, and B. Hainque (2002) Adipose Tissue IL-6 Content Correlates with Resistance to Insulin Activation of Glucose Uptake both in Vivo and in Vitro; *J Clin Endocrinol Metab.*; 87: 2084-2089.

[Bélanger, 2011]: D. Bélanger, J. Pinson (2011) Electrografting: a Powerful Method for Surface Modification; *Chem. Soc. Rev.*; 40: 3995-4048.

[Brichard, 2003]: S.M. Brichard, M.L. Delporte, M. Lambert (2003) Adipocytokines in Anorexia Nervosa: a Review Focusing on Leptin and Adiponectin; *Horm Metab Res*; 35: 337-342.

[Butler, 2006]: D. Butler, G.G. Guilbault (2006) Disposable Amperometric Immunosensor for the Detection of 17- $\beta$  Estradiol Using Screen-Printed Electrodes; *Sensor Actuator B*; 113: 692-699.

[Bruun, 2006]: J.M. Bruun, J.W. Helge, B. Richelsen, B. Stallknecht (2006) Diet and Exercise Reduce Low-Grade Inflammation and Macrophage Infiltration in Adipose Tissue but not in Skeletal Muscle in Severely Obese Subjects; *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; 290: 961-967.



[Campuzano, 2010]: S. Campuzano, B. Esteban-Fernández de Ávila, J. Yuste, M. Pedrero, J.L. García, P. García, E. García, J.M. Pingarrón (2010) Disposable Amperometric Magnetoimmunosensors for the Specific Detection of Streptococcus Pneumoniae; *Biosens. Bioelectron*; 26: 1225-1230.

[Campuzano, 2014]: S. Campuzano, V. Salema, M. Moreno-Guzmán, M. Gamella, P. Yáñez-Sedeño, L.A. Fernández, J.M. Pingarrón (2014) Disposable Amperometric Magnetoimmunosensors Using Nanobodies as Biorecognition Element. Determination of Fibrinogen in Plasma; *Biosens Bioelectron*; 52: 255-260.

[Cao, 2011]: Q. Cao, H. Zhao, Y. Yang, Y. He, N. Ding, J. Wang, Z. Wu, K. Xiang, G. Wang (2011) Electrochemical Immunosensor for Casein Based on Gold Nanoparticles and Poly(L-Arginine)/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite Film Functionalized Interface; *Biosens Bioelectron*; 26: 3469-3474.

[Carrillo de Albornoz, 2006]: A. Carrillo de Albornoz, A. García, A. Bascones (2006) Papel de la IL-6 y TNF- $\alpha$  en la enfermedad periodontal; *Av Periodon. Implantol*; 18: 83-89.

[Centi, 2007]: S. Centi, S. Laschi, M. Mascini (2007) Improvement of Analytical Performances of a Disposable Electrochemical Immunosensor by Using Magnetic Beads; *Talanta*; 73 394-399.

[Centi, 2008]: S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini (2008) Different Approaches for the Detection of Thrombin by an Electrochemical Aptamer-Based Assay Coupled to Magnetic Beads; *Biosens Bioelectron*; 23: 1602-1609.

[Chan, 2013]: K.Y. Chan, W.W. Ye, Y. Zhang, L.D. Xiao, P.H-M. Leung, Y. Li, M. Yang (2013) Ultrasensitive Eetection of E. Coli O157:H7 with Biofunctional Magnetic Bead Concentration Via Nanoporous Membrane Based Electrochemical Immunosensor; *Biosens. Bioelectron*; 41: 532-537.

[Che, 2010]: X. Che, R. Yuan, Y. Chai, J. Li, Z. Song, J. Wang (2010) Amperometric Immunosensor for the Determination of  $\alpha$ -1-Fetoprotein Based on Multiwalled Carbon Nanotube–Silver Nanoparticle Composite; *J. Coll. Interf. Sci.*; 345: 174-180.

[Chen, 2010]: W. Chen, Y. Lei, C. M. Li (2010) Regenerable Leptin Immunosensor Based on Protein G Immobilized Au-Pyrrole Propylic Acid-Polypyrrole Nanocomposite; *Electroanal*; 22: 1078-1083.

[Chen, 2011]: C. Chen, Y-C. Shiang, C-C. Huang, H-T. Chang (2011) Using Self-Assembled Aptamers and Fibrinogen-Conjugated Gold Nanoparticles to Detect DNA Based on Controlled Thrombin Activity; *Biosens Bioelectron*; 26: 3464-3468.

[Chitolie, 1994]: A. Chitolie, I.J. Mackie, D. Grant, J.L. Hamilton, S.M. Machin (1994) Inaccuracy of the 'Derived' Fibrinogen Measurement; *Blood Coagul Fibrinol*, 5: 955-957.

[Cignarelli, 1996]: M. Cignarelli, G. DePergola, G. Picca, M. Sciaraffia, N. Pannacciulli, M. Tarallo, E. Laudadio, E. Turrisi, R. Giorgino (1996) Relationship of Obesity and Body Fat Distribution with Ceruloplasmin Serum Levels; *Int. J. Obesity*; 20: 809-813.

[Claus, 1957]: A. Claus (1957) Rapid Physiological Coagulation Method in Determination of Fibrinogen; *Acta Haematologica*; 17: 237-246.

[Conneely, 2007]: G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, G.G. Guilbault (2007) Development of an Immunosensor for the Detection of Testosterone in Bovine Urine; *Anal Chim Acta*; 583: 153-160.

[Considine, 1996]: V. Considine, M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannessian, C. C. Marco, L. J. Mckee, T. L. Bauer and J. F. Caro (1996) Serum Immunoreactive Leptin Concentrations in Normal Weight and Obese Humans; *N. Engl. J. Med.*; 334: 292-295.

[Conzuelo, 2012]: F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D.G.Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J.M. Pingarrón (2012) Disposable and Integrated Amperometric Immunosensor for Direct Determination of Sulfonamide Antibiotics in Milk; *Biosens. Bioelectron*; 36: 81-88.

[Conzuelo, 2014]: F. Conzuelo, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Gamella, R.M. Torrente-Rodríguez, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón (2104) Rapid Screening of Multiple Antibiotic Residues in Milk Using Disposable Amperometric Magnetosensors; *Anal. Chim. Acta*; 820: 32-38.

[Cook, 1999]: B.C. Cook (1999) A turbidimetric Assay for Quantitating Functional Fibrin(ogen) Using Polystyrene-Divinylbenzene Microparticles; *Anal Biochem*; 270: 83-87.

[Cremer, 1994]: P. Cremer, D. Nagel, B. Labrot, H. Mann, R. Mucbe, H. Elster, C. Seidel (1994) Lipoprotein Lp(a) as Predictor of Myocardial Infarction in Comparison to Fibrinogen, LDL Cholesterol and Other Risk Factors: Results from the Prospective Gottingen Risk Incidence and Prevalence Study (GRIPS); *Eur J Clin Invest*; 24: 444-453.

## D

[Dancoine, 1997]: F. Dancoine, G. Couplet, J. Buvat, C. Guittard, G. Marcolin, J.C. Fournalin (1997) Analytical and Clinical Evaluation of the Immulite® Estradiol Assay in Serum From Patients Undergoing in Vitro Fertilization: Estradiol Increase in Mature Follicles; *Clin Chem*; 43: 1165-1171.

[Darain, 2003]: F. Darain, S. V. Park, Y. B. Shim (2003) Disposable Amperometric Immunosensor System for Rabbit IgG Using a Conducting Polymer Modified Screen-Printed Electrode; *Biosens Bioelectron*; 18: 773-780.

[De García Villa, 2011]: M. de Gracia Villa, C. Jiménez-Jorquera, I. Haro, M.J. Gomara, R. Sanmartí, C. Fernández-Sánchez, E. Mendoza (2011) Carbon Nanotube Composite Peptide-Based Biosensors as Putative Diagnostic Tools for Rheumatoid Arthritis; *Biosens Bioelectron*; 27: 113-118.

[De Maat, 1999]: M.P.M. De Maat, G.D.O. Lowe, F. Haverkate (1999) Fibrinogen. In: *Laboratory Techniques in Thrombosis: A Manual* (ed. by J. Jespersen, R.M. Bertina & F. Haverkate), 79-88. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

[Delporte, 2002]: M.L. Delporte, T. Funahashi, M. Takahashi, Y. Matsuzawa, S.M. Brichard, (2002) Preand Post-Translational Negative Effect of Beta-Adrenoceptor Agonists on Adiponectin Secretion: in Vitro and in Vivo Studies; *Biochem J*; 367: 677-685.

[Deng, 2011]: C. Deng, F. Qu, H. Sun, M. Yang (2011) Sensitive Electrochemical Immunosensor Based on Enlarged and Surface Charged Gold Nanoparticles Mediated Electron Transfer; *Sens Actuators B*; 160: 471-474.

[Díaz-González, 2005]: M. Díaz-González, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García (2005) Development of an Immunosensor for the Determination of Rabbit IgG Using Streptavidin Modified Screen-Printed Carbon Electrodes; *Talanta*; 65: 565-573.

[Díez, 2013]: P. Díez, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, V. Lanzone, A. Sánchez, E. Sánchez, B. Garcinuño, R. Villalonga, J.M. Pingarrón (2013) Biotin-Labeled Electropolymerized Network of Gold Nanoparticles for Amperometric Immunodetection of Human Fibrinogen; *ChemElectroChem*;1: 200-206.

[Ditschuneit, 1995]: H.H. Ditschuneit, M. Flechtner-Mors, G. Adler (1995) Fibrinogen in Obesity Before and After Weight Reduction; *Obes. Res.* 1995; 3: 43-48.

[Dong, 2014]: F. Dong, R. Luo, H. Chen, W. Zhang, S. Ding (2014) Amperometric Immunosensor Based on Carbon Nanotubes/Chitosan Film Modified Electrodes for Detection of Human Leptin; *Int J Electrochem Sci*; 9: 6924-6935.

[Draisci, 2000]: R. Draisci, G. Volpe, D. Compagnone, I. Purificato, F. delli Quadri (2000) Development of an Electrochemical ELISA for the Screening of 17 $\beta$ -Estradiol and Application to Bovine Serum; *Analyst* ; 125: 1419-1423.

[Dudek, 2010]: M.M. Dudek, T.L. Lindahl, A.J. Killard (2010) Development of a Point of Care Lateral Flow Device for Measuring Human Plasma Fibrinogen; *Anal Chem*; 82: 2029-2035.



[Ebersola, 2013]: J.L. Ebersola, J.L. Schuster, J. Stevens, D. Dawson III, R. Kryscio, Y. Lin, M.V. Thomas, C.S. Miller (2013) Patterns of Salivary Analytes Provide Diagnostic Capacity for Distinguishing Chronic Adult Periodontitis from Health; *J Clin Immunol*; 33: 271-279.

[Eguílaz, 2010]: M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2010) An Electrochemical Immunosensor for Testosterone Using Functionalized Magnetic Beads and Screen-Printed Carbon Electrodes; *Biosens Bioelectron*; 26: 517-522.

[Eissa, 2012]: S. Eissa, Tlili C, L. L'Hocine, M. Zourob (2012) Electrochemical Immunosensor for the Milk Allergen  $\beta$ -Lactoglobulin Based on Electrografting of Organic Film on Graphene Modified Screen-Printed Carbon Electrodes; *Biosens Bioelectron.*; 38: 308-13.

[Elgert, 1998]: K.D. Elgert (1998) Immunology: Understanding the immune system. Ed. John Wiley & Sons, Inc.; 58-78.

[Eliasson, 1993]: M. Eliasson, P.E. Evrin, D. Lundblad, K. Asplund, M. Ranby (1993) Influence of Gender, Age and Sampling Time on Plasma Fibrinolytic Variables and Fibrinogen: A Population Study; *Fibrinolysis*; 7: 316-323.

[Engstrom, 2003]: G. Engstrom, L. Stavenow, B. Hedblad, P. Lind, P. Tydén, L. Janzon, F. Lindgärde (2003) Inflammation Sensitive Plasma Proteins and Incidence of Myocardial Infarction in Men with Low Cardiovascular Risk; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 2003; 23: 2247-2251.

[Erel, 1998]: Erel O. (1998) Automated Measurement of Serum Ferroxidase Activity; *Clin Chem*; 44: 2313-2319.

[Eriksen, 1981]: P.B. Eriksen (1981) New Extraction Method for Radioimmunoassay of Serum Estradiol; *Clin Chem*; 27: 1926-1928.

[Escosura-Muñiz, 2009]: A. Escosura-Muñiz, M. Maltez-da Costa, A. Merkoci (2009) Controlling the Electrochemical Deposition of Silver onto Gold Nanoparticles: Reducing Interferences and Increasing the Sensitivity of Magnetoimmuno Assays; *Biosens. Bioelectron.*; 24: 2475-2482.

[Esteban-Fernández de Ávila, 2013]: B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.-P. Salvador, M.-P. Marco, J.M. Pingarrón (2013) Ultrasensitive Amperometric Magnetoimmunosensor for Human C-Reactive Protein Quantification in Serum; *Sens. Actuat. B*; 188: 212-220.

[Esteban-Fernández de Ávila, 2014]: B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, V. Lanzone, S. Campuzano, M. Pedrero, D. Compagnone, J.M. Pingarrón (2014) Multiplexed Determination of Amino-Terminal Pro-BType Natriuretic Peptide and C-Reactive Protein Cardiac Biomarkers in Human Serum at a Disposable Electrochemical Magnetoimmunosensor; *Electroanal.*; 26: 254-261.

## F

[Fantuzzi, 2000]: G. Fantuzzi, R. Faggioni (2000) Leptin in the Regulation of Immunity, Inflammation, and Hematopoiesis; *J. Leukoc. Biol.*; 68: 437-446.

[Fantuzzi, 2005]: G. Fantuzzi (2005) Adipose Tissue, Adipokines, and Inflammation; *J. Allergy Clin. Immunol.*; 115: 911-919.

[Ferguson-Smith, 1988]: A.C. Ferguson-Smith, Y.F. Chen, M.S. Newman, L.T. May, P.B. Sehgal, F.H. Ruddle (1988) Regional Localization of the Interferon-Beta 2/B-Cell Stimulatory Factor 2/Hepatocyte Stimulating Factor Gene to Human Chromosome 7p15-p21; *Genomics*; 2: 203-208.

[Fernández-Baldo, 2009]: M.A. Fernández-Baldo, G.A. Messina, M.I. Sanz, J. Raba (2009) Screen-Printed Immunosensor Modified with Carbon Nanotubes in a Continuous-Flow System for the Botrytis Cinerea Determination in Apple Tissues.; *Talanta*; 79: 681-686.

[Furukawa, 2004]: S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, I. Shimomura (2004) Increased Oxidative Stress in Obesity and its Impact on Metabolic Syndrome; *J Clin Invest*; 114: 1752-1761.

## G

[Gabay, 1999]: C. Gabay, M.D., I. Kushner, M.D. (1999) Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation; *N. Engl. J. Med.*; 340: 448-454.

[Gaffney, 1992]: P.J. Gaffney, M.Y. Wong (1992) Collaborative Study of a Proposed International Standard for Plasma Fibrinogen Measurement; *Thromb Haemost*; 68: 428-432.

[Gamella, 2012]: M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón (2012) Amperometric Magnetoimmunosensors for Direct Determination of D-Dimer in Human Serum; *Electroanal.*; 24: 2235-2243.

[Gautier, 2009]: C. Gautier O. Ghodbane, D.D.M. Wayner, D. Bélanger (2009) Modification of Glassy Carbon Electrodes by 4-Chloromethylphenyl Units and d-Glucosaminic Acid; *Electrochim. Acta*; 54: 6327-6334.

[Ghindilis, 1998]: A.L Ghindilis, P. Atanasov, M. Wilkinst, E. Wilkins (1998) Immunosensors: Electrochemical Sensing and Other Engineering Approaches; *Biosens. Bioelectron.*; 13: 113-131.

[Giagulli, 1994]: V.A. Giagulli, J.M. Kaufman, A. Vermeulen (1994) Pathogenesis of the Decreased Androgen Levels in Obese Men; *J Clin Endocrinol Metab*; 79: 997-1000.

[González, 2010]: M.B. González García, A. Costa García (2010) Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica; 197-222.

[Greenberg, 2006]: A.S. Greenberg, M.S. Obin (2006) Obesity and the Role of Adipose Tissue in Inflammation and Metabolism ; *Am. J. Clin. Nutr.*; 83: 461S-465S.

## ℋ

[Hale, 1995]: J.E. Hale (1995) Irreversible, Oriented Immobilization of Antibodies to Cobalt-Iminodiacetate Resin for Use as Immunoaffinity Media; *Anal. Biochem.*; 231: 46-49.

[Halleux, 2001]: C.M. Halleux, M. Takahashi, M.L. Delporte, R. Detry,; T. Funahashi, Y. Matsuzawa S.M. Brichard, (2001) Secretion of Adiponectin and Regulation of apM1 Gene Expression in Human Visceral Adipose Tissue; *Biochem Biophys Res Commun*; 288: 1102-1107.

[Hamad, 2011]: A.W.R Hamad, S.M. Gaphor, M.T. Shawagfeh, N.G. Al-Talabani (2011) Study of Serum and Salivary Levels of Proinflammatory Cytokines, Potential Biomarkers in the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma; *Academic J Cancer Res*; 4: 47-55.

[Hammett Stabler, 1996]: C. Hammett Stabler, G. Coburn, R. Jordan, W. Winter (1996) Turbidimetric Determination of Ceruloplasmin on the Hitachi 911; *Clin Chem*; 42: 44-47.

[Hantgan, 1994]: R.R. Hantgan, C.W. Francis, V.J. Marder (1994) Fibrinogen Structure and Physiology in: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles & Clinical Practice (ed. by R.W.Colman, J.Hirsh, V.J.Marder & E.W. Salzman), 277-300.

[Häussling, 1991]: L. Häussling, B. Michel, H. Ringsdorf, H. Rohrer (1991) Direct Observation of Streptavidin Specifically Adsorbed on Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers with the Scanning Tunneling Microscope; *Angew. Chem. Int. Ed.*; 30: 569-572.

[Havel, 2004]: P.J. Havel (2004) Update on Adipocyte Hormones: Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism; *Diabetes*; 53: S143-S151.

[Havlíková, 2006]: L. Havlíková, L. Nováková, L. Matysová, J. Šícha, P. Solich (2006) Determination of Estradiol and Its Degradation Products by Liquid Chromatography; *J Chromatogr A*; 1119: 216-223.

[Hayama, 2010]: S. Hayama, T. Higuchi, H. Miyakoshi, Y. Nakano (2010) Analytical Evaluation of a High-Molecular-Weight (HMW) Adiponectin Chemiluminescent Enzyme Immunoassay; *Clin Chim Acta*; 411: 2073-2078.

[Hayat, 2011ACA]: A. Hayat, L. Barthelmebs, J.-L. Marty (2011) Enzyme-Linked Immunosensor Based on Super Paramagnetic Nanobeads for Easy and Rapid Detection of Okadaic Acid; *Anal Chim Acta*; 690: 248-252.

[Hayat, 2011T]: A. Hayat, L. Barthelmebs, A. Sassolas, J.-L. Marty (2011) An Electrochemical Immunosensor Based on Covalent Immobilization of Okadaic Acid onto Screen Printed Carbon Electrode via Diazotization-Coupling Reaction; *Talanta*; 85: 513-518.

[He, 2009]: P. He, Z. Wang, L. Zhang, W. Yang (2009) Development of a Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on Carbon Nanotube for Rapid Determination of Clenbuterol; *Food Chem.*; 112: 707-714.

[He, 2013]: Y. He, X. Wang, Y. Zhang, F. Gao, Y. Li, H. Chen, L. Wang (2013) An Ultrasensitive Chemiluminescent Immunosensor for the Detection of Human Leptin Using Hemin/G-Quadruplex DNAzymes-Assembled Signal Amplifier; *Talanta*; 116: 816-821.

[Henry, 1960]: R.J. Henry, N. Chiamori, S.L. Jacobs, M. Segalove (1960) Determination of Ceruloplasmin Oxidase in Serum; *Proc Soc Exp Bio Med*; 104:620-624.

[Hernández, 2011]: K. Hernández, R. Fernández-Lafuente (2011) Control of Protein Immobilization: Coupling Immobilization and Site-Directed Mutagenesis to Improve Biocatalyst or Biosensor Performance; *Enzyme Microb Technol.*; 48: 107-122.

[Hervás, 2010]: M. Hervás, M.A. López, A. Escarpa (2010) Simplified Calibration and Analysis on Screen-Printed Disposable Platforms for Electrochemical Magnetic Bead-Based Immunosensing of Zearalenone in Baby Food Samples; *Biosens. Bioelectron.*; 25: 1755-1760.

[Hill, 2013]: J.W. Hill, M. Alreja, C.F. Elias (2013) From Precocious Puberty to Infertility: Metabolic Control of the Reproductive Function; *Front. Endocrinol. (Lausanne)*; 4: 43.

[Honegger, 2005]: A. Honegger (2005) Binding affinities of recombinant Protein L, Protein LA, Protein A, and Protein G Immunoglobulin binding domains. En la página web de Atlas of Antibody Anatomy ([www.bioc.uzh.ch/antibody](http://www.bioc.uzh.ch/antibody)).

[Hong, 2007]: D.S. Hong, L.S. Angelo, R. Kurzrock (2007) Interleukin-6 and Its Receptor in Cancer: Implications for Translational Therapeutics; *Cancer*; 110: 1911-1928.

[Hong, 2012]: C. Hong, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhuo, X. Yang (2012) A Strategy for Signal Amplification Using an Amperometric Enzyme Immunosensor Based on HRP Modified Platinum Nanoparticles; *J. Electroanal. Chem.*; 664: 20-25.

[Horn, 1996]: R. Horn, R. Geldszus, E. Potter, A. vonzurMuhlen, G. Brabant (1996) Radioimmunoassay for the Detection of Leptin in Human Serum; *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 104: 454.

[Huang, 2010]: K.J. Huang, D.J. Niu, W.Z. Xie, W. Wang (2010) A Disposable Electrochemical Immunosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Nano-Au/Multi-Walled Carbon Nanotubes-Chitosans Nanocomposite Film Modified Glassy Carbon Electrode; *Anal. Chim. Acta*; 659: 102-108.

[Humphries, 1999]: S.E. Humphries, J.A. Henry, H.E. Montgomery (1999) Gene–Environment Interaction in the Determination of Levels of Haemostatic Variables Involved in Thrombosis and Fibrinolysis; *Blood Coagulation and Fibrinolysis*; 10: s17–s21.

[Huy, 2011]: T.Q. Huy, N.T.H. Hanh, P.V. Chung, D.D. Anh, P.T. Nga, M.A. Tuan (2011) Characterization of Immobilization Methods of Antiviral Antibodies in Serum for Electrochemical Biosensors; *Appl Surf Sci*; 257: 7090-7095.



[Iijima, 1999]: S. Iijima, M. Yudasaka, R. Yamada, S. Bandow, K. Suenaga, F. Kokai, K. Takahashi (1999) Nano-Aggregates of Single-Walled Graphitic Carbon Nano-Horns; *Chem. Phys. Lett.*; 309: 165-170.

[Ilcol, 2006]: Y. O. Ilcol, Z. B. Hizli and T. Ozkan (2006) Leptin Concentration in Breast Milk and Its Relationship to Duration of Lactation and Hormonal Status; *Int. Breastfeed J.*; 1: 21-29.

[Interchim 2007]: IgG Binding to Protein A, G and L (2007). En la página web de Protein A, G, L immunoreagents ([www.interchim.fr](http://www.interchim.fr)).

[Ito, 2000]: S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda (2000) Highly Sensitive Electrochemical Detection of Alkaline Phosphatase; *Anal Chim Acta*; 424: 57-63.



[Jacobs, 2010]: C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton (2010) Carbon Nanotube Based Electrochemical Sensors for Biomolecules; *Anal Chim Acta*; 662: 105-127.

[Jiang, 2006]: Z.-L. Jiang, S.-J. Sun, A.-H. Liang, C.-J. Liu (2006) A New Immune Resonance Scattering Spectral Assay for Trace Fibrinogen with Gold Nanoparticle Label; *Anal Chim Acta*; 571: 200-205.

[Jiang, 2007]: Z. Jiang, Y.Y. Chen, A.H. Liang, H.L. Tao, N.L. Tang, F.X. Zhong (2007) Silver nanoparticle labeled immunoresonance scattering spectral assay for trace fibrinogen; *Sci China Ser B-Chem*; 50: 345-350.

[Jiang, 2008]: Jiang, X.; Li, D.; Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y.; Ye, Z.; Wang (2008) Immunosensors for Detection of Pesticide Residues; *Biosens. Bioelectron*; 23: 1577-1587.

[Jiang, 2009]: T.H. Jiang, L.X. Zhao, B.L. Chua, Q.Z. Feng, W. Yan, J.M. Lin (2009) Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for the Selective Determination of 17Beta-Estradiol in Fishery Samples with High Performance Liquid Chromatography; *Talanta*; 78: 442-447.

[Jung, 2007]: Y. Jung, J. Lee, B. Chung (2007) Self-Directed and Self-Oriented Immobilization of Antibody by Protein G–DNA Conjugate; *Anal. Chem.*; 79: 6534-6541.

## K

[Kaçar, 2015]: C. Kaçar, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, S. Campuzano, E. Kilic, J.M. Pingarrón (2015) Amperometric magnetoimmunoassay for the determination of lipoprotein(a); *Microchim. Acta*; 182: 1457-1464.

[Kadowaki, 2006]: T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, y K. Tobe (2006) Adiponectin and Adiponectin Receptors in Insulin Resistance, Diabetes, and the Metabolic Syndrome; *J Clin Invest*; 116: 1784-1792.

[Kawaguchi, 2006]: M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa (2006) Dual Derivatization-Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of 17 $\beta$ -Estradiol in Water Sample; *J Chromatogr A*; 1105: 140-147.

[Kerr, 2001]: R. Kerr, D. Stirling, C.A. Ludlam (2001) Interleukin 6 and Haemostasis; *Br. J. Haematol.*; 2001: 115: 3-12.

[Kim, 2002]: C.H. Kim, J.Y. Park, J.Y. Kim, C.S. Choi, Y.I. Kim, Y.E. Chung, M.S. Lee, S.K. Hong, K.U. Lee (2002) Elevated Serum Ceruloplasmin Levels in Subjects with Metabolic Syndrome: a Population-Based Study; *Metabolism*; 51: 838-844.

[Kim, 2007]: Y. S. Kim, H. S. Jung, T. Matsuura, H. Y. Lee, T. 429 Kawai, M.B. Gu (2007) Electrochemical Detection of 17 $\beta$ -Estradiol Using DNA Aptamer Immobilized Gold Electrode Chip; *Biosens Bioelectron*; 22: 2525-2531.

[Kim, 2011]: O.Y. Kim, M.J. Shin, J. Moon, J.H. Chung (2011) Plasma Ceruloplasmin as a Biomarker for Obesity: a Proteomic Approach; *Clin. Biochem.*; 44: 351-356.

[Korman, 2008]: D. Korman, I. Volenbergh, J. Balko, J. Webster, F.V. Schiodt, R.H. Squires, R.J. Fontana Jr, W. M. Lee, M.L. Schilsky (2008) Screening for Wilson Disease in Acute Liver Failure: a Comparison of Currently Available Diagnostic Tests; *Hepatology*; 48: 1167-1174.

[Kratzsch, 2002]: J. Kratzsch, A. Berthold, A. Lammert, W. Reuter, E. Keller, W. Kiess (2002) A Rapid, Quantitative Immunofunctional Assay for Measuring Human Leptin; *Horm Res*; 57: 127-132.

[Kroggh-Madsen, 2006]: R. Kroggh-Madsen, P. Plomgaard, K. Moller, B. Mittendorfer, B.K. Pedersen (2006) Influence of TNF-Alpha and IL-6 Infusions on Insulin Sensitivity and Expression of IL-18 in Humans; *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; 2006; 291: 108-114.

[Kuramitz, 2003]: H. Kuramitz, M. Matsuda, J.H. Thomas, K. Sugawara, S. Tanaka (2003) Electrochemical Immunoassay at a 17 $\beta$ -Estradiol Self-Assembled Monolayer Electrode Using a Redox Marker.; *Analyst*; 128: 182-186.



[Lahiri, 1999]: J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G.M. Whitesides (1999) A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study; *Anal. Chem.*; 71: 777-790.

[Langa, 2015]: M. Barrejón, S. Pla, I. Berlanga, M.J. Gómez-Escalonilla, L. Martín-Gomis, J.L.G. Fierro, M. Zhang, M. Yudasaka, S. Iijima, H.B. Gobeze, F. D'Souza, A. Sastre-Santos, F. Langa (2015) Covalent Decoration onto the Outer Walls of Double Wall Carbon Nanotubes with Perylenediimides: Synthesis, Characterization and Photoinduced Electron Transfer; *J. Mat. Chem. C*; DOI: 10.1039/C5TC00425J

[Lee, 2009]: S. Lee, S. Lee, Y.-H. Ko, H. Jung, J. D. Kim, J. M. Song, J. Choo, S. K. Eo, S. H. Kang (2009) Quantitative Analysis of Human Serum Leptin Using a Nanoarray Protein Chip Based on Single-Molecule Sandwich Immunoassay; *Talanta*; 78: 608-612.

[Lermo, 2008]: A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernández, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori (2009) Immunoassay for Folic Acid Detection in Vitamin-Fortified Milk Based on Electrochemical Magneto Sensors; *Biosens. Bioelectron.*; 24: 2057-2063.

[Li, 2010]: Z. Li, Y. Wang, J. Wang, Z. Tang, J.G. Pounds, Y. Lin (2010) Rapid and Sensitive Detection of Protein Biomarker Using a Portable Fluorescence Biosensor Based on Quantum Dots and a Lateral Flow Test Strip; *Anal Chem*; 82: 7008-7014.

[Li, 2011]: T. Li, M. Yang (2011) Electrochemical Sensor Utilizing Ferrocene Loaded Porous Polyelectrolyte Nanoparticles as Label for the Detection of Protein Biomarker IL-6; *Sens. Actuat. B*; 158: 361-365.

[Li, 2013]: J. Li, S. Liu, J. Yu, W. Lian, M. Cui, W. Xu, J. Huang (2013) Electrochemical Immunosensor Based on Graphene-Polyaniline Composites and Carboxylated Graphene Oxide for Estradiol Detection; *Sens Actuat B-Chem*; 188: 99-105.

[Life Tech. Corp., 2013]: Antibody Compatibility Table: Dynabeads® Protein A & Dynabeads® Protein G (2013). En la página web de Life Technologies ([www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)).

[Lin, 2009]: T.H. Lin, W.H. Hung (2009) Electrochemical Deposition of Gold Nanoparticles on a Glassy Carbon Electrode Modified with Sulfanilic Acid; *J. Electrochem. Soc.*; 156: D45-D50

[Lin, 2012]: Z. Lin, L. Chen, G. Zhang, Q. Liu, B. Qiu, Z. Cai, G. Chen (2012) Label-Free Aptamer-Based Electrochemical Impedance Biosensor for 17 $\beta$ -Estradiol; *Analyst*; 137: 819-822.

[Liu, 2000]: J. Liu, L. Cheng, B. Liu, S. Dong (2000) Covalent Modification of a Glassy Carbon Surface by 4-Aminobenzoic Acid and Its Application in Fabrication of a Polyoxometalates-Consisting Monolayer and Multilayer Films; *Langmuir*; 16: 7471-7476.

[Liu, 2006]: G. Liu, J.J. Gooding (2006) An Interface Comprising Molecular Wires and Poly(ethylene glycol) Spacer Units Self-Assembled on Carbon Electrodes for Studies of Protein Electrochemistry; *Langmuir*; 22: 7421-7430

[Liu, 2007]: X. Liu, D.K.Y. Wong (2007) Electrocatalytic Detection of Estradiol at a Carbon Nanotube|Ni(Cyclam) Composite Electrode Fabricated Based on a Two-Factorial Design; *Anal Chim Acta*; 594: 184-191.

[Liu, 2008]: X. Liu, L. Shi, W. Niu, H. Li, G. Xu (2008) Amperometric Glucose Biosensor Based on Single-Walled Carbon Nanohorns; *Biosens Bioelectron*; 23: 1887-1890.

[Liu, 2009T]: X. Liu, D. K.Y. Wong (2009) Picogram-Detection of Estradiol at an Electrochemical Immunosensor with a Gold Nanoparticle|Protein G-(LC-SPDP)-Scaffold; *Talanta*; 77: 1437-1443.

[Liu 2009ACS]: K. Liu, W. Wang, Z. Xu, X. Bai, E. Wang, Y. Yao, J. Zhang, Z. Liu (2009) Chirality-Dependent Transport Properties of Double-Walled Nanotubes Measured in Situ on Their Field-Effect Transistors; *J. Am. Chem. Soc.*; 131: 62-63.

[Liu, 2010a]: X. Liu, H. Li, F. Wang, S. Zhu, Y. Wang, G. Xu (2010) Functionalized Single-Walled Carbon Nanohorns for Electrochemical Biosensing; *Biosens Bioelectron*; 25: 2194-2199.

[Liu, 2010b]: X. Liu, P.A. Duckworth, D.K.Y. Wong (2010) Square Wave Voltammetry Versus Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Rapid Detection Technique at Electrochemical Immunosensors; *Biosens Bioelectron*; 25: 1467-1473.

[Liu, 2011]: G. Liu, H. Chen, H. Peng, S. Song, J. Gao, J. Lu, M. Ding, L. Li, S. Ren, Z. Zou, C. Fan, (2011) A Carbon Nanotube-Based High-Sensitivity Electrochemical Immunosensor for Rapid and Portable Detection of Clenbuterol.; *Biosens Bioelectron*; 28: 308-313.

[Liu, 2012] J. Liu, Y. Duan (2012) Saliva: a Potential Media for Disease Diagnostics and Monitoring; *Oral Oncol*; 48: 569-577.

[Liu, 2014]: F. Liu, G. Xiang, R. Yuan, X. Chen, F. Luo, D. Jiang, S. Huang, Y. Li, X. Pu (2014) Procalcitonin Sensitive Detection Based on Graphene–Gold Nanocomposite Film Sensor Platform and Single-Walled Carbon Nanohorns/Hollow Pt Chains Complex as Signal Tags; *Biosens. Bioelectron.*; 60: 210-217.

[López-Ávila, 2006]: V. López-Ávila, O. Sharpe, W.H. Robinson (2006) Determination of Ceruloplasmin in Human Serum by SEC-ICPMS; *Anal Bioanal Chem*; 386: 180-187.

[Lowe, 1999]: G.D.O. Lowe, A. Rumley (1999) Use of Fibrinogen and Fibrin D-Dimer in Prediction of Arterial Thrombotic Events; *Thrombosis and Haemostasis*; 82: 667-672.

[Lowe, 2004]: G.D.O. Lowe, A. Rumley, I.J. Mackie (2004) Plasma Fibrinogen; *Ann. Clin. Biochem.*; 41: 430-440.

[Ludlam, 1995]: C.A. Ludlam, B. Bennett, K.A.A. Fox, G.D.O. Lowe, A.W. Reid (1995) Guidelines for the Use of Thrombolytic Therapy; *Blood Coagulation and Fibrinolysis*; 6: 273-285.



[Ma, 2005]: Y. Ma, Q. Gao, X. Yang, (2005) Immobilization of Glycosylated Enzymes on Carbon Electrodes, and its Application in Biosensors; *Microchim. Acta*; 150: 21-26.

[**Maeda, 1996**]: K. Maeda, K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, K. Matsubara (1996) cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-Like Factor apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1); *Biochem Biophys Res Commun*; 221: 286-289.

[**Majima, 2002**]: K. Majima, T. Fukui, J. Yuan, G. Wang, K. Matsumoto (2002) Quantitative Measurement of 17 $\beta$ -Estradiol and Estriol in River Water by Time-Resolved Fluoroimmunoassay; *Anal Sci*; 18: 869-874.

[**Malhotra, 2010**]: R. Malhotra, V. Patel, J.P. Vaqué, J.S. Gutkind, J.F. Rusling (2010) Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification; *Anal. Chem.*; 82: 3118-3123.

[**Mani, 2009**]: V. Mani, B.V. Chikkaveeraiah, V. Patel, J.S. Gutkind, J.F. Rusling (2009) Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification; *ACSNANO* 3: 585-594.

[**Martínez de Morentin, 2014**]: P. Martínez de Morentin, I. González-García, L. Martins, et.al. (2014) Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK; *Cell Metab.*; 20: 41-53.

[**Mattos, 2013**]: A.B. Mattos, T.A. Freitas, L.T. Kubota, R.F. Dutra (2013) Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. essential oil hydrodistillation; *Biochem. Eng. J.*; 71: 97-104.

[**Mauvais-Jarvis, 2011**]: F. Mauvais-Jarvis (2011) Estrogen and Androgen Receptors: Regulators of Fuel Homeostasis and Emerging Targets for Diabetes and Obesity; *Trends Endocrin. Met.*; 22: 24-33.

[**Mauvais-Jarvis, 2013**]: F. Mauvais-Jarvis, D.J. Clegg, A.L. Hevener (2013) The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis; *Endocr. Rev.*; 34: 309-338.

[**May, 1992**]: L.T. May, H. Viguet, J. S. Kenney, N. Ida, A. C. Allison, P. B. Sehgal (1992) High Levels of "Complexed" Interleukin-6 in Human Blood; *J. Biol. Chem.*; 267: 19698-19704.

[**Mertens, 1983**]: R. Mertens, R.J. Liedtke, J.D. Batjer (1983) Evaluation of a Radioimmunoassay for Estradiol in Unextracted Serum; *Clin Chem*; 29: 1961-1963.

[**Messina, 2008**]: G.A. Messina, N.V. Panini, N.A. Martínez, J. Raba (2008) Microfluidic Immunosensor Design for the Quantification of Interleukin-6 in Human Serum Samples; *Anal. Biochem.*; 380: 262-267.

[**Miale, 1977**]: J.B. Miale Laboratory Medicine Hematology, The C.V. Mosby Company, London, 5<sup>th</sup> ed. 1977, p. 469.

[**Moore, 2011**]: K.E. Moore, B.S. Flavel, A.V. Ellis, J.G. Shapter (2011) Comparison of Double-Walled with Single-Walled Carbon Nanotube Electrodes by Electrochemistry; *Carbon*; 49: 2639-2647.

[**Moreno, 2000**]: B. Moreno Esteban; S. Monereo Megías; J. Álvarez Hernández (2000) Obesidad, la Epidemia del Siglo XXI.

**[Moreno-Guzmán, 2010]:** M. Moreno-Guzmán, M. Eguílaz, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2010) Disposable Immunosensor for Cortisol Using Functionalized Magnetic Particles; *Analyst*; 135: 1926-1933.

**[Moreno-Guzmán, 2011]:** M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2011) A Disposable Electrochemical Immunosensor for Prolactin Involving Affinity Reaction on Streptavidin-Functionalized Magnetic Particles; *Analytica Chimica Acta*; 692: 125-130.

**[Moreno-Guzmán, 2012E]:** M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2012) Multiplexed Ultrasensitive Determination of Adrenocorticotropin and Cortisol Hormones at a Dual Electrochemical Immunosensor; *Electroanal.*; 24: 1100-1108.

**[Moreno-Guzmán, 2012BB]:** M. Moreno-Guzmán, I. Ojeda, R. Villalonga, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2012) Ultrasensitive Detection of Adrenocorticotropin Hormone (ACTH) Using Disposable Phenylboronic-Modified Electrochemical Immunosensors; *Biosens. Bioelectron.*; 35: 82-86.

**[Muir, 2007]:** W. Muir, M.C. Barden, S.P. Collett, A.-D. Gorse, R. Monteiro, L. Yang, N.A. McDougall, S. Gould, N.J. Maeji (2007) High-Throughput Optimization of Surfaces for Antibody Immobilization Using Metal Complexes.; *Anal. Biochem.*; 363: 97-107.

**[Mukerjee, 1990]:** H. Mukerjee (1990) A Kinetic Method for Determination of Serum Ceruloplasmin; *Clin Chem*; 36: 391-392.

**[Munge, 2009]:** B.S. Munge, C.E. Krause, R. Malhotra, V. Patel, J.S. Gutkind, J.F. Rusling (2009) Electrochemical Immunosensors for Interleukin-6. Comparison of Carbon Nanotube Forest and Gold Nanoparticle Platforms; *Electrochem. Commun.*; 11: 1009-1012.

**[Muruzabal, 2002]:** F. J. Muruzabal, G. Fruhbeck, J. Gomez-Ambrosi, M. Archanco, M. A. Burrell. (2002) Immunocytochemical Detection of Leptin in Non-Mammalian Vertebrate Stomach *Gen Comp Endocrinol*; 128: 149-152.



**[Nakayama, 2008]:** K. Nakayama, M. Kubota, Y. Katoh, Y. Sawada, A. Saito, K. Nishimura, E. Katsura, N. Ichihara, T. Suzuki, H. Kouguchi, M. Tamura, H. Honma, S. Kanzaki, H. Itami, A. Ohtake, K. Kobayashi, T. Ariga, K. Fujieda, N. Shimizu, T. Aoki (2008) Early and Presymptomatic Detection of Wilson's Disease at the Mandatory 3-Year-Old Medical Health Care Examination in Hokkaido Prefecture with the Use of a Novel Automated Urinary Ceruloplasmin Assay; *Mol Genet Metab*; 94: 363-367.

**[Ndangili, 2011]:** P. M. Ndangili, A. M. Jijana, P.G.L. Baker, E. I. Iwuoha (2011) 3-Mercaptopropionic Acid Capped ZnSe Quantum Dot-Cytochrome P450 3A4 Enzyme Biotransducer for  $17\beta$ -Estradiol; *J Electroanal Chem*; 653: 67-74.

**[Nicholson, 1965]:** R.S. Nicholson (1965) Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics; *Anal Chem*; 37: 1351-1355

**[Nishimura, 2011]:** Nishimura, Y. Sato, M. Tanaka, R. Kurita, K. Nakamoto, O. Niwa (2011) Bifunctional Tri(ethylene glycol) Alkanethiol Monolayer Modified Gold Electrode for on Chip Electrochemical Immunoassay of pg Level Leptin; *Anal Sci*; 27: 465-469.

### O

**[Oberbach, 2011]:** A. Oberbach, M. Blüher, H. Wirth, H. Till, P. Kovacs, Y. Kullnick, N. Schlichting, J.M. Tomm, U. Rolle-Kampczyk, J. Murugaiyan, H. Binder, A. Dietrich, M. von Bergen (2011) Combined Proteomic and Metabolomic Profiling of Serum Reveals Association of the Complement System with Obesity and Identifies Novel Markers of Body Fat Mass Changes; *J. Proteome Res.*; 10: 4769-4788.

**[Ooi, 2014]:** H.W. Ooi, S. J. Cooper, C.-Y. Huang, D. Jennins, E. Chung, N. J. Maeji, A.K. Whittaker, (2014) Coordination Complexes as Molecular Glue for Immobilization of Antibodies on Cyclic Olefin Copolymer Surfaces; *Anal. Biochem.*; 456: 6–13.

**[Orel, 2004]:** M. Orel, R. Lichnovska, S. Gwozdziwiczova, N. Zlamalova, I. Klementa, A. Merkunova, J. Hrebicek (2004) Gender Differences in Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Leptin Secretion from Subcutaneous and Visceral Fat Tissue; *Physiol. Res.*; 53: 501-505.

**[Osaki, 1996]:** S. Osaki, D.A. Johnson, E. Frieden (1996) The Possible Significance of the Ferrous Oxidase Activity of Ceruloplasmin in Normal Human Serum; *J Biol. Chem.*; 241: 2746-2751.

**[Ouchi, 2007]:** N. Ouchi, K. Walsh (2007) Adiponectin as an Anti-Inflammatory Factor; *Clin Chim Acta*; 380: 24-30.

### P

**[Pagona, 2006]:** G. Pagona, N. Tagmatarchis, J. Fan, M. Yudasaka; S. Iijima (2006) Cone-End Functionalization of Carbon Nanohorns; *Chem Mater.*; 18: 3918-3920.

**[Pemberton, 2005]:** R.M. Pemberton, T.T. Mottram, J.P. Hart (2005) Development of a Screen-Printed Carbon Electrochemical Immunosensor for pM Concentrations of Estradiol in Human Serum Extracts; *J Biochem Biophys Methods*; 63: 201-212.

**[Peng, 2011]:** J. Peng, L.-N. Feng, Z.-J. Ren, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu (2011) Synthesis of Silver Nanoparticle–Hollow Titanium Phosphate Sphere Hybrid as a Label for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Human Interleukin-6; *Small*; 7: 2921-2928.

**[Pinilla, 1995]:** E. Pinilla Gil, R.M. Garcia-Moncó Carra, A. Sánchez Misiego (1995) Determination of Copper in Human Plasma by Stripping Potentiometry on a Mercury Film Electrode in Ethylenediamine Medium; *Anal Chim Acta*; 315: 69-76.

**[Piwowarska, 2010]:** J. Piwowarska, S. Radowicki, J. Pachecka (2010) Hops (*Humulus Lupulus*) Inhibits Oxidative Estrogen Metabolism and Estrogen-Induced Malignant Transformation in Human Mammary Epithelial Cells (MCF-10A); *Talanta*; 81: 275-280.

**[Pradhan, 2001]:** A.D. Pradhan, J.E. Manson, N. Rifai, J.E. Buring, P.M. Ridker (2001) C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus; *J. Am. Med. Assoc.*; 286: 327-34.

[Preechaworapun, 2008]: A. Preechaworapun, T.A. Ivandini, A. Suzuki, A. Fujishima, O. Chailapakul, Y. Einaga (2008) Development of Amperometric Immunosensor Using Boron-Doped Diamond with Poly(o-aminobenzoic acid); *Anal. Chem.*; 80: 2077-2083.

[Puertas, 2013]: S. Puertas, M.G. Villa, E. Mendoza, C. Jiménez-Jorquera, J. de la Fuente, C. Fernández-Sánchez, V. Grazú (2013) Improving Immunosensor Performance Through Oriented Immobilization of Antibodies on Carbon Nanotube Composite Surfaces; *Biosens Bioelectron*; 43: 274-280.

[Pumera, 2007JNN]: M. Pumera, B. Smid (2007) Redox Protein Noncovalent Functionalization of Double-Wall Carbon Nanotubes: Electrochemical Binder-less Glucose Biosensor; *J Nanosci Nanotechnol*; 7: 3590-3595.

[Pumera, 2007NRL]: M. Pumera (2007) Electrochemical Properties of Double Wall Carbon Nanotube Electrodes; *Nanoscale Res Lett*, 2: 87-93.

[Punbusayakul, 2013]: N. Punbusayakul, S. Talapatra, P.M Ajayan, W. Surareungchai (2013) Label-Free as-Grown Double Wall Carbon Nanotubes Bundles for Salmonella Typhimurium Immunoassay; *Chem Central J*; 7 102.

## R

[Radi, 2009]: A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, V. Lates, J.-L. Marty (2009) Label-Free Impedimetric Immunosensor for Sensitive Detection of Ochratoxin A; *Biosens. Bioelectron*; 24: 1888-1892.

[Rao, 1998]: S.V. Rao, K.W. Anderson, L.G. Bachas (1998) Oriented Immobilization of Proteins; *Mikrochim. Acta*; 128: 127-143

[Resto, 2001]: M. Resto, D. O'Connor, K. Leef, V. Funanage, M. Spear, R. Locke (2001) Leptin Levels in Preterm Human Breast Milk and Infant Formula; *Pediatrics*; 108: e15.

[Ricci, 2012]: F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi (2012) A Review of Experimental Aspects of Electrochemical Immunosensors; *Electrochim. Acta*; 84: 74-83.

[Richards, 1998]: M. P. Richards, T. J. Caperna, J. P. McMurtry (1998) Development of a Polyclonal Peptide Antiserum for the Universal Detection of Leptin; *Faseb J*; 12: A835.

[Richards, 2000]: M. P. Richards, T. J. Caperna, T. H. Elsasser, C. M. Ashwell, J. P. McMurtry (2000) Design and Application of a Polyclonal Peptide Antiserum for the Universal Detection of Leptin Protein; *J Biochem Biophys Methods*; 45: 147-156.

[Rodríguez, 2008] L.M. Rodríguez, B. Robles, J.M. Marugán, Á. Suárez, F. Santos (2008) Urinary Interleukin-6 is Useful in Distinguishing Between Upper and Lower Urinary Tract Infections; *Pediatr Nephrol*; 23: 429-433

[Romanazzo, 2010]: D. Romanazzo, F. Ricci, G. Volpe, C.T. Elliott, S. Vesco, K. Kroeger, D. Moscone, J. Stroka, H. Van Egmond, M. Vehniainen, G. Palleschi (2010) Development of a Recombinant Fab-Fragment Based Electrochemical Immunosensor for Deoxynivalenol Detection in Food Samples; *Biosens. Bioelectron.*; 25: 2615-2621.

[Rosicka, 2003]: M. Rosicka, M. Krsek, M. Matoulek, Z. Jarkovska, J. Marek, V. Justova and Z. Lacinova (2003) Serum Ghrelin Levels in Obese Patients: The Relationship to Serum Leptin Levels and Soluble Leptin Receptors Levels; *Physiol. Res.*; 52: 61-66.

[Rossi, 1988]: E. Rossi, P. Mondonico, A. Lombardi, L. Preda (1988) Method for Determination of Functional (Clottable) Fibrinogen by the New Family of ACL Coagulometers; *Thromb Res*; 52: 453-468.

[Ruth, 2001]: A. Ruth (2001) Clinical Measurement of Steroid Metabolism; *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 15: 1-16.

[Ryokkynen, 2003]: A. Ryokkynen, A. M. Mustonen, T. Pyykonen, S. Hanninen, J. Asikainen, J. V. K. Kukkonen, J. Mononen, P. Nieminen (2003) Detection, Analysis and Interactions of Plasma Ghrelin, Leptin and Growth Hormone in the Mink (*Mustela vison*); *Zool Sci*; 20: 1127-1132.

## S

[Saby, 1997]: C. Saby, B. Ortiz, G.Y. Champagne, D. 454 Belanger (1997) Electrochemical Modification of Glassy Carbon Electrode Using Aromatic Diazonium Salts. 1. Blocking Effect of 4-Nitrophenyl and 4-Carboxyphenyl Groups; *Langmuir*; 13: 6805-6813.

[Salcý, 2002]: B. Salcý, I. Biryol (2002) Voltametric Investigation of  $\beta$ -Estradiol; *J Pharm Biomed Anal*; 28: 753-759.

[Salinas-Torres, 2011]: D. Salinas-Torres; F. Huerta, F. Montilla, E. Morallón (2011) Study on Electroactive and Electrocatalytic Surfaces of Single Walled Carbon nNanotube-Modified eElectrodes; *Electrochim. Acta*; 56: 2464-2470.

[Sánchez, 2005]: R.D. Sánchez, R.D. Zysler (2005) "Magnetismo de sistemas nanoscópicos, algunas aplicaciones"; *Ciencia Hoy*; 15: 40-51.

[Sato, 1996]: H. Sato, H. Mochizuki, Y. Tomita, T. Kanamori (1996) Enhancement of the Sensitivity of a Chemiluminescent Immunoassay for Estradiol Based on Hapten Heterology; *Clin. Biochem.*; 29: 509-513

[Sato, 2010] J. Sato, J. Goto, T. Murata, S. Kitamori, Y. Yamazaki, A. Satoh, Y. Kitagawa (2010) Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 110: 330-336.

[Scherer, 2003]: P.E. Scherer (2003) The Role of Adiponectine in Carbohydrate and Lipid Metabolism; *Endocrine Abstract*; 5: S20.

[Schosinsky, 1974]: K.H. Schosinsky, H.P. Lehmann, M.F. Beeler (1974) Measurement of Ceruloplasmin from Its Oxidase Activity in Serum by Use of o-Dianisidine Dihydrochloride; *Clin Chem*; 20: 1556-1563.

[Sekigushi, 2011]: S. Sekigushi, H. Kohno, K. Yasukawa, K. Inouye, Biosci (2011) Study on Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for the Measurement of Leptin; *Biotechnol Biochem*; 75: 752-756.

[Serdula, 1993]: M.K. Serdula, D. Ivery, R.J. Coates, D.S. Freedman, D.F. Williamson, T. Byers (1993) Do Obese Children Become Obese Adults? A Review of the Literature; *Prev Med*; 22: 167-77.

[Sheu, 2006] J.N. Sheu, M.C. Chen, K.H. Lu, S.L. Cheng, I.C. Lee, S.M. Chen, G.J. Tsay (2006) Serum and Urine Levels of Interleukin-6 and Interleukin-8 in Children with Acute Pyelonephritis; *Cytokine*; 36: 276-282.

[Shi, 2006]: Y. Shi, G. T. Yan, J. Lin (2006) Intestinal ischemia–Reperfusion Injury Made Leptin Decreased; *Regul. Pept*; 133: 27-31.

[Shi, 2009]: L. Shi, X. Liu, W. Niu, H. Li, S. Han, J. Chen, G. Xu (2009) Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Direct Electrochemistry of Soybean Peroxidase Immobilized on Single-Walled Carbon Nanohorn Modified Electrode; *Biosens Bioelectron*; 24: 1159-1163.

[Sobrova, 2012]: P. Sobrova, M. Rývolová, D. Huska, J. Hubálek, I. Provazník, V. Adam, R. Kizek (2012) Voltammetry of Adiponectin and its Interactions with Collagen on a Carbon Paste Electrode at Femtogram Level; *Int. J. Electrochem. Sci.*; 7: 1-12

[Solomon, 2006]: A. Solomon, J.A. Martínez (2006) Participación del Sistema Nervioso y del Tracto Gastrointestinal en la Homeostasis Energética; *Rev Med Univ Navarra*; 50: 27-37.

[Somani, 2007]: B.L. Somani, V. Ambade (2007) Hyperlipidemic Profiles During Remission in Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome; *Clin. Biochem.*; 40: 571-574.

[Somers, 1997]: W. Somers, M. Stahl, J.S. Seehra. (1997) 1.9 a Crystal Structure of Interleukin 6: Implications for a Novel Mode of Receptor Dimerization and Signaling; *EMBO J.*, 16: 989-997.

[Sriwichai, 2010]: S. Sriwichai, A. Baba, S. Phanichphant, K. Shinbo, K. Kato, F. Kaneko (2010) Electrochemically Controlled Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Human Immunoglobulin G on Poly(3-Aminobenzoic acid) Ultrathin Films; *Sensor Actuator B*; 147: 322-329.

[Stopforth, 2007]: A. Stopforth, B.V. Burger, A.M. Crouch, P. Sandra (2007) The Analysis of Estrone and 17 $\beta$ -Estradiol by Stir Bar Sorptive Extraction–Thermal Desorption–Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Application to Urine Samples After Oral Administration of Conjugated Equine Estrogens; *J Chromatogr B*; 856: 156-164

[Stryer, 2003]: L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko (2003) Bioquímica, 5ª ed. Reverté, S.A., Barcelona, España ISBN: 84-291-7484-9; 921- 950.

[Sunderman, 1970]: F.W. Sunderman Jr, S. Nomoto (1970) Measurement of Human Serum Ceruloplasmin by Its p-Phenylenediamine Oxidase Activity; *Clin Chem*; 16: 903-910.

[Suresh, 2010]: S. Suresh, A.K. Gupta, V.K. Rao, Om kumar, R. Vijayaraghavan (2010) Amperometric Immunosensor for Ricin by Using on Graphite and Carbon Nanotube Paste Electrodes; *Talanta*; 81: 703-708.

[Sweetnam, 1996] P.M. Sweetnam, H.F. Thomas, J.W.G. Yarnell, A. Beswick, I.A. Baker, P.C. Elwood (1996) Fibrinogen, Viscosity and the 10-Year Incidence of Ischaemic Heart Disease. The Caerphilly and Speedwell Studies; *Eur Heart J*; 17: 1814-1820.

[Sweetnam, 1998]: P.M. Sweetnam, J.W.G. Yarnell, G.D.O. Lowe, I.A. Baker, J.R. O'Brien, A. Rumley, M.D. Etherington, P.J. Whitehead, P.C. Elwood (1998) The Relative Predictive Power of Heat-Precipitation Nephelometric and Clottable (Claus) Fibrinogen in the Prediction of Ischaemic Heart Disease: the Caerphilly and Speedwell Studie; *Br J Haematol Br J Haematol*; 100: 582-588.

## J

[Tamate, 1997]: K. Tamate, M. Charleton, J.P. Gosling, D. Egan, M. Ishikawa, P.F. Fottrell (1997) Direct Colorimetric Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay for Estradiol-17 $\beta$  in Saliva; *Clin Chem*; 43: 1159-1164.

[Tang, 2010]: Z. Tang, H. Wu, D. Du, J. Wang, H. Wang, W.J. Qian, D.J. Bigelow, J.G. Pounds, R.D. Smith, Y. Lin, (2010) Sensitive Immunoassays of Nitrated Fibrinogen in Human Biofluids; *Talanta*; 81: 1662-1669.

[Tao, 2009]: H. Tao, W. Wei, X. Zeng, X. Liu, X. Zhang, Y. Zhang (2009) Electrocatalytic Oxidation and Determination of Estradiol Using an Electrode Modified with Carbon Nanotubes and an Ionic Liquid; *Microchim. Acta*; 166: 53-59.

[Tedeschi, 2003]: L. Tedeschi, C. Domenici, A. Ahluwalia,; F. Baldini, A. Mencaglia (2003) Antibody Immobilisation on Fibre Optic TIRF Sensors; *Biosens. Bioelectron*; 19: 85-93.

[Thanakun, 2014]: S. Thanakun, H. Watanabe, S. Thaweboon, Y. Izumi (2014) Comparison of Salivary and Plasma Adiponectin and Leptin in Patients with Metabolic Syndrome; *Diabetol Metab Syndr*; 6:19.

[Therhault, 2001]: A. Therhault, T. Agdinaoay, N.B. Ladao, H. Chang, A. Grandinetti (2001) Clinical evaluation of a new non-isotopic leptin immunoassay; *Clin Lab. Sci*; 14: 6-8.

[Tijssen, 1985]: P. Tijssen (1985) "Practice and theory of enzyme immunoassays" en: R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg, eds., "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", 15: 414.

[Torrente-Rodríguez, 2014]: R.M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, M. Gamella, F. Conzuelo, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón (2014) Amperometric Disposable Magnetoimmunosensor for Determination of Fibrinogen in Plasma; *Chemical Sensors*; 4: 7.

[Trayhurn, 2011]: P. Trayhurn, C.A. Drevon, J. Eckel (2011) Secreted Proteins from Adipose Tissue and Skeletal Muscle - Adipokines, Myokines and Adipose/Muscle Cross-Talk; *Arch Physiol Biochem.*; 117: 47-56.

[Turková, 1999]: J. Turková (1999) Oriented Immobilization of Biologically Active Proteins as a Tool for Revealing Protein Interactions and Function; *J. Chromatogr. B*; 722: 11-31.

## V

[Vairavapandian, 2008]: D. Vairavapandian, P. Vichchulada, M. Lay (2008) Preparation and Modification of Carbon Nanotubes: Review of Recent Advances and Applications in Catalysis and Sensing; *Anal Chim Acta*; 626: 119-129.

[Van Oers, 1988] M.H. Van Oers, A.A. Van der Heyden, L.A. Aarden (1988) Interleukin 6 (IL-6) in Serum and Urine of Renal Transplant Recipients; *Clin Exp Immunol*; 71: 314-319.

[Vega, 2007]: D. Vega, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón (2007) Electrochemical Detection of Phenolic Estrogenic Compounds at Carbon Nanotube-Modified Electrodes; *Talanta*; 71: 1031-1038.

[Verma, 2011]: P. Verma, P. Maire, P. Novak (2011) Concatenation of Electrochemical Grafting with Chemical or Electrochemical Modification for Preparing Electrodes with Specific Surface Functionality; *Electrochim. Acta*; 56: 3555-3561.

[Viswanathan, 2012]: S. Viswanathan, C. Rani, J.A. Ho (2012) Electrochemical Immunosensor for Multiplexed Detection of Food-borne Pathogens Using Nanocrystal Bioconjugates and MWCNT Screen-Printed Electrode; *Talanta*; 94: 315-319.

[Volpe, 2006]: G. Volpe, G. Fares, F. delli Quadri, R. Draisci, G. Ferretti, C. Marchiafava, D. Moscone, G. Palleschi (2006) A Disposable Immunosensor for Detection of 17 $\beta$ -Estradiol in Non-Extracted Bovine Serum; *Anal Chim Acta*; 572: 11-16.

## W

[Wang, 2001]: Y.-C. Wang, P. Su, X.X. Zhang, W.-B. Chang (2001) Enhancement of the Sensitivity of a Capillary Electrophoresis Immunoassay for Estradiol with Laser-Induced Fluorescence Based on a Fluorescein-Labeled Secondary Antibody; *Anal. Chem.*; 73: 5616-5619.

[Wang, 2004]: H. Wang, D. Li, Z. Wu, G. Shen, R. Yu (2004) A Reusable Piezo-Immunosensor with Amplified Sensitivity for Ceruloplasmin Based on Plasma-Polymerized Film; *Talanta*; 62: 199-206.

[Wang, 2006]: Z.H. Wang, A.S. Viana, G. Jin, L.M. Abrantes (2006) Immunosensor Interface Based on Physical and Chemical Immunoglobulin G Adsorption Onto Mixed Self-Assembled Monolayers; *Bioelectrochem.*; 69: 180-186.

[Wang, 2011L]: G. Wang, H. Huang, G. Zhang, X. Zhang, B. Fang, L. Wang (2011) Dual Amplification Strategy for the Fabrication of Highly Sensitive Interleukin-6 Amperometric Immunosensor Based on Poly-Dopamine; *Langmuir*; 27: 1224-1231.

[Wang, 2011BB]: R. Wang, A. Lajevardi-Khosh, S. Choi, J. Chae (2011) Regenerative Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor: Real-Time Measurement of Fibrinogen in Undiluted Human Serum Using the Competitive Adsorption of Proteins; *Biosens Bioelectron*; 28: 304-307.

[Wang, 2012]: W. Wang, N.D. Walker, L.-J. Zhu, W. Wu, L. Ge, D.E. Gutstein, N.A. Yates, D.C. Hendickson, M.L. Ogletree, M. Cleary, G.J. Opitck, Z. Chen (2012) Quantification of Circulating D-dimer by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Tandem Mass Spectrometry; *Anal Chem*; 84: 6891-6898.

[Wang, 2014]: G. Wang, X. He, L. Chen, Y. Zhu, X. Zhang (2014) Ultrasensitive IL-6 Electrochemical Immunosensor Based on Au Nanoparticles-Graphene-Silica Biointerface; *Coll. Surf. B*; 116: 714-719.

[Weisberg, 2003]: S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W.Jr Ferrante (2003) Obesity is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue; *J. Clin. Invest.*; 112: 1796-808.

[Winkles, 1988]: J. Winkles, A.F. Jones, P. Winyard, D.R. Blake, J. Lunec (1988) An Automated Method for the Kinetic Measurement of Ferroxidase Activity; *J Ann Clin Biochem*; 25: 250-254.

[Wu, 2008]: P. Wu, D.G. Castner, D.W. Grainger (2008) Diagnostic Devices as Biomaterials: a Review of Nucleic Acid and Protein Microarray Surface Performance Issues; *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*; 19: 725-753.

[Wu, 2012]: K. Wu, H. Qiu, J. Hu, N. Sun, Z. Zhu, M. Li, Z. Shi (2012) Electrochemistry of Double-Wall Carbon Nanotubes Encapsulating C60 and their Spectral Characterization; *Carbon*; 50: 4401-4408.

### X

[Xin, 2008]: T.B. Xin, S.X. Liang, X. Wang, H.F. Li, J.M. Lin (2008) Determination of Estradiol in Human Serum Using Magnetic Particles-Based Chemiluminescence Immunoassay; *Anal Chim Acta*; 627: 277-284.

### Y

[Yan, 2002]: G. T. Yan, X. H. Hao, H. Xue, Y. P. Lu (2002) Establishment of a Highly Sensitive Leptin Radioimmunoassay and Detection of Increased Leptin Levels in Hyperlipidemia and Pregnancy; *J Immunoassay Immunochem*; 23: 317-326.

[Yang, 2005]: Z. Yang, D.M. Zhou (2005) Development of a Biosensor for Measuring Plasma Fibrinogen Based on an Enzyme Kinetic Model; *Biotechnol Lett*; 27: 1689-1694.

[Yang, 2006]: G. Yang, Y. Shen, M. Wang, H. Chen, B. Liu, S. Dong (2006) Copper Hexacyanoferrate Multilayer Films on Glassy Carbon Electrode Modified with 4-Aminobenzoic Acid in Aqueous Solution; *Talanta*; 68: 741-747.

[Yang, 2014]: F. Yang, J. Han, Y. Zhuo, Z. Yang, Y. Chai, R. Yuan. (2014) Highly Sensitive Impedimetric Immunosensor Based on Single-Walled Carbon Nanohorns as Labels and Bienzyme Biocatalyzed Precipitation as Enhancer for Cancer Biomarker Detection; *Biosens Bioelectron*; 55: 360-365.

[Yuanyuan, 2006]: X. Yuanyuan, X. Shanhong, B. Chao, C. Shaofeng (2006) A Micro Amperometric Immunosensor for Detection of Human Immunoglobulin; *Science in China Series F*; 49: 397-408.

[Yudasaka, 2008]: M. Yudasaka, S. Iijima, V.H. Crespi, (2008) Single-Wall Carbon Nanohorns and Nanocones; *Top Appl Phys*; 111: 605-629.

[Yudkin, 2000]: J.S. Yudkin, M. Kumari, S.E. Humphries, V. Mohamed-Ali (2000) Inflammation, Obesity, Stress and Coronary Heart Disease: is Interleukin-6 the Link?; *Atherosclerosis*; 148: 209-14.



[Zacco, 2007]: E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori (2007) Electrochemical Magneto Immunosensing of Antibiotic Residues in Milk; *Biosens. Bioelectron*; 22: 2184-2191

[Zang, 2007]: M. Zhang, M. Yudasaka, K. Ajima, J. Miyawaki, S. Iijima, (2007) Light-Assisted Oxidation of Single-Wall Carbon Nanohorns for Abundant Creation of Oxygenated Groups that Enable Chemical Modifications with Proteins To Enhance Biocompatibility; *ACS Nano*; 1: 265-272.

[Zang, 2009]: L. Zhang, J. Lei, J. Zhang, L. Ding, H. Ju (2009) Amperometric Detection of Hypoxanthine and Xanthine by Enzymatic Amplification Using a Gold Nanoparticles–Carbon Nanohorn Hybrid as the Carrier; *Analyst*; 137: 3126-3131.

[Zang, 2010]: J. Zhang, J. Lei, C. Xu, L. Ding, H. Ju (2010) Carbon Nanohorn Sensitized Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR; *Anal Chem*; 82: 1117-1122.

[Zarei, 2012]: H. Zarei, H. Ghourchian, K. Eskandari, M. Zeinali (2012) Magnetic Nanocomposite of Anti-Human IgG/COOH–Multiwalled Carbon Nanotubes/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as a Platform for Electrochemical Immunoassay; *Anal. Biochem.*; 421; 446-453.

[Zhang, 2001]: L. Zhang, Y.G. Sun (2001) Covalent Modification of Glassy Carbon Electrodes with Beta Alanine for Voltammetric Separation of Dopamine and Ascorbic Acid; *Anal. Sci.*; 17: 939-943.

[Zhang, 2011]: Y. Zhang, Y. Xiang, Y. Chai, R. Yuan, X. Qian, H. Zhang, Y. Chen, J. Su, J. Xu (2011) Gold Nanolabels and Enzymatic Recycling Dual Amplification-Based Electrochemical Immunosensor for the Highly Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen; *Jin Sci China Chem*; 54: 1770–1776

[Zhang, 2012]: X. Zhang, W. Dou, X. Zhan, G. Zhao (2012) A Novel Immunosensor for Enterobacter Sakazakii Based on Multiwalled Carbon Nanotube/Ionic Liquid/Thionine Modified Electrode; *Electrochim Acta*; 61: 73-77.

[Zhao, 2014]: C. Zhao, J. Wu, H. Ju, F. Yan (2014) Multiplexed Electrochemical Immunoassay Using Streptavidin/Nanogold/Carbon Nanohorn as a Signal Tag to Induce Silver Deposition; *Anal. Chim. Acta*; 847: 37-43.

[Zhu, 2010]: S. Zhu, G. Xu (2010) Single-Walled Carbon Nanohorns and Their Applications; *Nanoscale*; 2: 2538-2549.



## **8. GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

---





Ⓐ

**Ab:** anticuerpo  
**ACTH:** adrenocorticotropina  
**AFM:** microscopía de fuerza atómica  
**Ag:** antígeno  
**Anti-APN:** anti-adiponectina policlonal de ratón.  
**Anti-Cp:** anti-ceruloplasmina policlonal de conejo  
**Anti-Cp-biotin:** anti-ceruloplasmina biotinilado policlonal de conejo  
**Anti-E2-biotin:** anti-estradiol biotinilado monoclonal de roedor  
**Anti-IL-6:** anti-interleucina-6 monoclonal de ratón  
**Anti-Lep:** anti-leptina monoclonal de ratón  
**Anti-Lep-biotin:** anti-leptina biotinilado policlonal de conejo  
**AP:** fosfatasa alcalina  
**AP-anti-IgG:** anti-IgG de ratón Fc específico producido en cabra marcado con fosfatasa  
**AP-Cp:** ceruloplasmina marcada con fosfatasa alcalina  
**APN:** adiponectina

Ⓑ

**Biotin:** biotina  
**Biotin-anti-APN:** anti-adiponectinabiotinilado policlonal de conejo

**Biotin-anti-IL-6:** anti-interleucina-6 biotinilado monoclonal

**BSA:** albúmina de suero bovino

Ⓒ

**CNH:** nanocuernos de carbono  
**CNT:** nanotubos de carbono  
**Cp:** ceruloplasmina

Ⓓ

**D-D:** D-Dímero  
**DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos  
**DWCNT:** nanotubos de pared doble funcionalizados con radicales 4-aminofenilo.

Ⓔ

**E2:** 17 β-estradiol  
**EC<sub>50</sub>:** concentración que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo  
**EDC:** N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida  
**EDTA:** ácido etilendiamino-tetracético (sal disódica)  
**EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica.  
**ELISA:** ensayo por inmunabsorción ligado a enzimas

Ⓕ

**Fc:** fragmento cristizable del anticuerpo  
**FE-SEM:** microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo

**Fib:** fibrinógeno

Ⓖ

**Hb:** hemoglobina  
**hGH:** hormona del crecimiento  
**HOOC-MBs:** partículas magnéticas carboxiladas  
**HQ:** hidroquinona  
**HRP:** peroxidasa de rábano  
**HRP-E2:** 17 β-estradiol marcado con peroxidasa  
**HRP-anti-Fib-HRP:** anti-fibrinógeno policlonal marcado con peroxidasa  
**HRP-anti-IgG :** anti-IgG de conejo “whole molecule” producido en cabra marcado con peroxidasa  
**HRP-Strept:** estreptavidina marcada con peroxidasa  
**HR-TEM:** microscopía electrónica de transición de alta resolución

Ⓖ

**IgG:** inmunoglobulina  
**IL-6:** interleucina 6  
**IL-8:** interleucina 8  
**IMC:** índice de masa corporal  
**ISPs:** proteínas sensibles a la inflamación

Ⓖ

**Lep:** leptina

Ⓖ

**MBs:** partículas magnéticas

**MES:** ácido 2-morfolino-etanosulfónico

**MWCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple

### ϯ

**NHSS:** N-hidroxisulfo-succinimida

**NP:** 1-naftol

**NPP:** 1-naftilfosfato

**NQ:** naftoquinona

### ℘

**pABA:** ácido 4-aminobenzoico

**PBS:** disolución reguladora de fosfato de sodio

**PBS':** disolución reguladora de fosfato de potasio

**PBST:** disolución reguladora de fosfato de sodio suplementada con Tween®20

**PBST':** disolución reguladora de fosfato de potasio suplementada con Tween®20

**Poli-HRP-Strept:** polímero de estreptavidina marcado con peroxidasa

**PRL:** prolactina

**PROG:** progesterona

**Prot A:** proteína A

**Protein A-MBs:** partículas magnéticas funcionalizadas con Proteína A

### ℛ

**R<sub>ct</sub>:** Resistencia a la transferencia de carga

### §

**S<sub>b</sub>:** desviación estándar del blanco

**SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono

**Strept-MBs:** partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina

### §

**TEST:** testosterona

**TNFα:** factor de necrosis tumoral alfa

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**Tris-binding:** Tris-HCl 50 mM de pH 7.4 + 140 mM NaCl + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

**Tris-coating:** Tris-HCl 5 mM de pH 7.4 + 1 M NaCl + 0.5 mM EDTA

**Tris-HCl:** clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano

**Tris-washing:** Tris-HCl 10 mM de pH 7.4 + 2 mM NaCl + 1 mM EDTA

**Trizma®:** tris(hidroximetil)-aminometano

## **9. PUBLICACIONES**

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line that intersect at the right end of the horizontal line, positioned to the right of the section header.



## **A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk**

*Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés,  
Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel Pingarrón*





## A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk

Cite this: *Analyst*, 2013, **138**, 4284

Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño\* and José M. Pingarrón

The preparation of a disposable electrochemical immunosensor for the quantification of the hormone leptin is described in this work. The preparation approach involved immobilization of a specific biotinylated anti-leptin antibody on the surface of streptavidin-functionalized magnetic beads (Strept-MBs) and a sandwich-type immunoassay involving the target analyte, monoclonal anti-leptin, and IgG labeled with alkaline phosphatase (AP-IgG). The electrochemical transduction step was accomplished by trapping the MBs bearing the immunoconjugates onto screen-printed carbon electrodes (SPCEs) by means of an Nd magnet and measuring the electrochemical oxidation of the 1-naphthol generated in the AP enzyme reaction upon 1-naphthyl phosphate (1-NPP) additions by differential pulse voltammetry (DPV). A calibration plot with a linear range between 5 and 100 pg mL<sup>-1</sup> as well as a detection limit of 0.5 pg mL<sup>-1</sup> (3s<sub>b</sub>/m) were achieved. This value is more than 27 times lower than that reported in the only voltammetric immunosensor for leptin described in the literature until now. The usefulness of the immunosensor was demonstrated by analyzing different types of real samples: human serum, infant powdered milk, and breast milk from a nursing mother with two months of breastfeeding.

Received 24th January 2013

Accepted 19th April 2013

DOI: 10.1039/c3an00183k

www.rsc.org/analyst

### 1 Introduction

Leptin is a 16 kDa peptide hormone that plays an important role in regulating food intake and body composition in mammals.<sup>1</sup> It is mainly released from adipose tissue and thought to act as an adiposity signal to the brain, promoting anorexia.<sup>2,3</sup> The level of this hormone directly reflects energy status<sup>4</sup> and appears as a central link between adiposity, appetite and weight. It seems to contribute to body weight regulation by controlling food intake and energy expenditure at the hypothalamic level.<sup>5,6</sup> In humans, leptin is associated with obesity, appetite regulation, energy expenditure, and reproduction. Normal levels are 3.7–11.1 ng mL<sup>-1</sup> in women and 2.0–5.6 ng mL<sup>-1</sup> in men, whereas noticeably higher leptin levels have been observed in obese individuals.<sup>7–9</sup> In mammals, leptin is expressed primarily in white adipose tissue, although other tissues such as gastric epithelial lining, placenta, muscle, brain, pituitary, and hypothalamus have also been found to be sites of leptin expression. The leptin function in the regulation of appetite, energy metabolism and fertility, and in the maintenance of body weight by acting as a peripheral hormone ‘sensor’ for the size of adipocyte energy (lipid) stores has been reported.<sup>10</sup> Human mammary epithelial cells are able to synthesize the hormone, which is also present in breast milk suggesting that leptin in human milk might be involved in the regulation of postnatal nutrition and growth.<sup>11</sup> In

fact, it has been claimed that breast milk leptin provides protective effects against overweight in adulthood and it has been proposed as an important factor that could partially explain the increased risk of obesity of formula-fed infants with respect to breastfed infants.<sup>12</sup> Moreover, although no infant formula contains leptin, this compound could be added to the formula and delivered through various feeding methods without loss.<sup>13</sup>

Analytical methods involving capillary electrophoresis,<sup>14,15</sup> immunofunctional assay,<sup>16</sup> enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),<sup>17</sup> radioimmunoassay<sup>18–22</sup> and western blotting<sup>23–25</sup> techniques have been used to determine human leptin. Various ELISA kits based on the use of peroxidase-labelled immunoreagents and colorimetric detection by addition of hydrogen peroxide in the presence of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) are commercially available. The analytical characteristics of some representative examples of these methods are summarized in Table 1. Apart from these, a nanoarray protein chip involving a sandwich fluorescence immunoassay monitored by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) was also reported.<sup>4</sup> Moreover, a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) using anti-leptin polyclonal antibody and alkaline phosphatase, achieving a detection limit of 0.1 pg mL<sup>-1</sup>, has been reported more recently.<sup>26</sup>

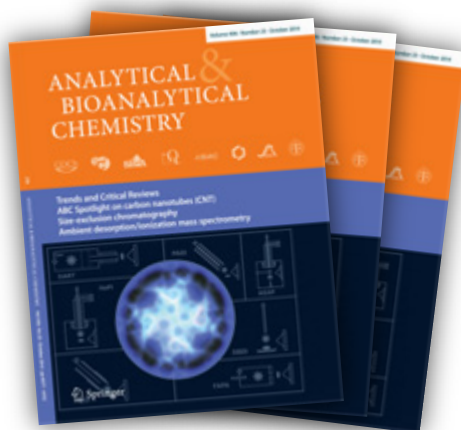
Regarding electrochemical immunosensors, to the best of our knowledge, only two configurations have been proposed. One of the approaches involved the use of a tri(ethylene glycol)-terminated alkanethiol (TEGCnSH)-modified gold electrode on which the capture antibody was covalently immobilized. Leptin and

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: yseo@quim.ucm.es



# **Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification**

*Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés,  
Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel Pingarrón*





# Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification

I. Ojeda · M. Moreno-Guzmán · A. González-Cortés ·  
P. Yáñez-Sedeño · J. M. Pingarrón

Received: 9 May 2014 / Revised: 24 June 2014 / Accepted: 21 July 2014 / Published online: 1 August 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** A novel magnetoimmunosensor design for interleukin-6 (IL-6) which involved the covalent immobilization of anti-IL-6 antibodies onto carboxyl-functionalized magnetic microparticles and a sandwich-type immunoassay with signal amplification using poly-HRP-streptavidin conjugates is reported. All the variables concerning the preparation and the electroanalytical performance of the immunosensor were optimized. The use of poly-HRP-strept conjugates as enzymatic labels instead of conventional HRP-strept allowed enhanced signal-to-blank current ratios to be obtained. A linear calibration plot between the measured steady-state current and the log of IL-6 concentration was achieved in the 1.75 to 500 pg/mL range, which was not feasible when using HRP-strept as label. A limit of detection of 0.39 pg/mL IL-6 was obtained. The anti-IL-6-MB conjugates exhibited an excellent storage stability providing amperometric responses with no significant loss during at least 36 days. The magnetoimmunosensor showed also an excellent selectivity against potentially interfering substances. The immunosensor was used to determine IL-6 in urine samples spiked at three different concentration levels with clinical relevance. Moreover, IL-6 was measured in three different saliva samples corresponding to a periodontitis patient, a smoker volunteer, and a non-smoker volunteer. The obtained results were statistically in agreement with those provided by a commercial ELISA kit.

**Keywords** Interleukin-6 · Electrochemical magnetoimmunosensor · Signal amplification · Poly-HRP-streptavidin · Urine · Saliva

I. Ojeda · M. Moreno-Guzmán · A. González-Cortés ·  
P. Yáñez-Sedeño (✉) · J. M. Pingarrón  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,  
University Complutense of Madrid, Madrid 28040, Spain  
e-mail: yseo@quim.ucm.es

## Introduction

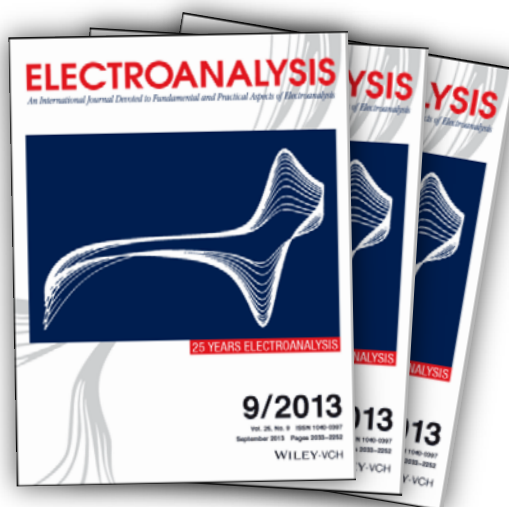
Human interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine encoded in humans by the IL-6 gene [1]. It is a single polypeptide containing 185 amino acids that forms a bundle of four  $\alpha$ -helices [2]. This protein has a lead role in the inflammatory response [3], acting as both proinflammatory and anti-inflammatory cytokine [4]. IL-6 is relevant in various disease processes such as diabetes and Alzheimer's illness and constitutes a suitable biomarker for prostate cancer [5] or head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [6]. Moreover, nowadays, it is widely avowed that obesity is a chronic inflammatory state, as adipose tissue is one of the main sources of inflammatory mediators including IL-6 [7]. Adipose tissue is recognized to be an active endocrine organ and a source of a large number of cytokines and bioactive mediators generally referred to as adipokines [8]. The secretion of IL-6 is regulated by different factors such as hormones, diet, and others. Elevated IL-6 levels in obese patients have also been found [9]; this leads IL-6 to be considered as a biomarker for subcutaneous adipose tissue (SAT), white adipose tissue (WAT), body mass index (BMI), and waist circumference (WC) [10].

The IL-6 level in serum of healthy individuals is about 6 pg/mL [11], and it can increase up to the nanogram per milliliter range in the presence of disease states. In contrast with the levels found for some other cancer biomarkers, such as prostate-specific antigen (PSA), with nanogram per milliliter concentration ranges in normal patients, IL-6 levels are around 1,000-fold lower, which highlights the need for very sensitive analytical methods for IL-6 determination to be used in cancer diagnosis [12]. Furthermore, it is also important to remark that, although serum is the sample most frequently analyzed in IL-6 tests, alternative samples collected by non-invasive means, such as saliva or urine, must be considered as matrices suitable for the diagnosis based on IL-6 levels.



## Electrochemical Magnetic Immunosensors for the Determination of Ceruloplasmin

Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés,  
Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel Pingarrón





# Electrochemical Magnetic Immunosensors for the Determination of Ceruloplasmin

Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño,\* José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain

\*e-mail: yseo@quim.ucm.es

Received: June 12, 2013

Accepted: July 8, 2013

Published online: August 27, 2013

## Abstract

Electrochemical immunosensors for ceruloplasmin (Cp) are reported for the first time. Two configurations involving magnetic beads (MBs) functionalized with Protein A or Streptavidin for immobilization of Cp antibodies were compared, using competitive immunoassay with synthesized alkaline phosphatase-Cp conjugate. Upon capturing MBs-immunoconjugates onto screen-printed carbon electrodes, quantification of Cp was accomplished by DPV measurement of 1-naphthol generated after 1-naphthylphosphate addition. Linear ranges of calibration curves and detection limits were 0.1–1000  $\mu\text{g/mL}$  and 0.040  $\mu\text{g/mL}$  (Protein A-MBs), and 0.025–20  $\mu\text{g/mL}$  and 0.018  $\mu\text{g/mL}$  (Strept-MBs). Good results were obtained in the determination of Cp in spiked human serum samples.

**Keywords:** Ceruloplasmin, Electrochemical magnetic immunosensor, Human serum

DOI: 10.1002/elan.201300269

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201300269>.

## 1 Introduction

Ceruloplasmin (Cp) is a copper-transporting  $\alpha_2$ -glyco-protein also known under the name of ferroxidase because of its oxidase activity towards ferrous ions [1]. Cp acts as a source of copper for peripheral organs where this element constitutes an essential cofactor for many enzymes [2]. The normal levels of Cp in serum are 250–470  $\mu\text{g/mL}$  for women and 250–370  $\mu\text{g/mL}$  for men [3]. The increased activity of Cp is an index of inflammation while the low levels (<20  $\mu\text{g/mL}$  in adults) are associated with Wilson's disease, an infrequent cause of chronic liver disease [4,5]. High concentration levels of Cp are particularly notable in diseases of the reticuloendothelial system such as Hodgkin's disease as well as during pregnancy or use of contraceptive pills [6]. Increased urinary excretion of Cp, IgG and transferrin also predicts future development of microalbuminuria [7]. Several studies have also reported the positive correlations of body fat mass or weight gains with Cp and other inflammation sensitive plasma proteins (ISPs). It has been proposed that proinflammatory cytokines produced in the adipose tissue increase the hepatic synthesis of ISPs which are known as important cardiovascular diseases risk factors [8].

High serum levels of Cp have been found in patients with central obesity, these concentrations also being correlated with serum triglyceride and cholesterol levels and visceral fat accumulation [9]. Therefore, Cp among other ISPs can be used as a biomarker for obesity, particularly

in relation with inflammation-associated proteins [8]. Since Cp has been shown to increase in response to the atherosclerotic inflammatory process, the determination of this protein might also be a useful tool to identify patients with the highest risk for myocardial infarction [9].

Various colorimetric assays for Cp based on the oxidase activity of this protein with substrates such as *p*-phenylenediamine (PPD) [10,11] or dianisidine (3,3'-dimethoxybenzidine) dihydrochloride [12] were reported in the earlier 70 s. Later, kinetic methods using *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine monohydro-chloride (DPPD) [13] or  $\text{Fe}^{2+}$  [14,15] were also described. Turbidimetry [5,16], inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) [17] and stripping potentiometry [18] were also employed for the determination of Cp. Different immunoassays for this protein have been developed and commercial kits based on such immunoaffinity schemes are currently available. Some examples are summarized in Table 1, where the analytical performance of the kits, including information on the fundamentals of the methodologies, concentration ranges, limits of detection, precision, type of samples and assay time, have been collected.

Regarding immunosensors, only one example has been found in the literature consisting of a reusable piezo-immunosensor for Cp based on plasma-polymerized film (PPF) [19]. Anti-ceruloplasmin antibody (anti-Cp) was electrostatically adsorbed on the PPF-modified crystal through an oppositely charged polyelectrolyte layer of alginate. An optimized assay medium containing polyethy-

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### **Optimization of the performance conditions of the anti-Cp-Protein A-MBs and anti-Cp-Biotin-Strept-MBs immunosensors**

Firstly, the antibody loading onto the functionalized MBs was evaluated by measuring the DP voltammetric response obtained with different immunosensors, in the absence of Cp, constructed with immunoconjugates prepared by re-suspending 30  $\mu\text{g}$  of Protein A-MBs in 25  $\mu\text{L}$  of solutions containing anti-Cp ranging between 0 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and AP-Cp conjugate in the 1 to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  range. As it can be seen in Figure S1a, the peak current increased with anti-Cp loading in the whole concentration range tested reaching a saturation level for each AP-Cp concentration. Moreover, Figure S1b shows the  $i_p$  values measured for Cp concentrations between 0 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with different immunosensors prepared with anti-Cp in the 0 - 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  loading range and using in each case the AP-Cp concentration corresponding to the saturation level. It can be observed as the largest difference between the responses obtained for the different Cp concentrations was achieved with 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AP-Cp. These results are in agreement when considering that a low antibody concentration would lead to a higher sensitivity since less analyte would be required to reach the saturation level [1]. Accordingly, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AP-Cp were selected for further work. Furthermore, no significant differences in the DP voltammetric responses were observed for 15 and 60 min incubation time of anti-Cp onto Protein A-MBs (Figure S1c). Accordingly, the shorter time was chosen for further work. The incubation time to achieve the best competition between Cp and AP-Cp was also optimized with the results shown in Figure S2d. An incubation time of 30 minutes was selected because it provided the largest peak current difference with respect to that measured when no Cp was in solution. The influence of the 1-

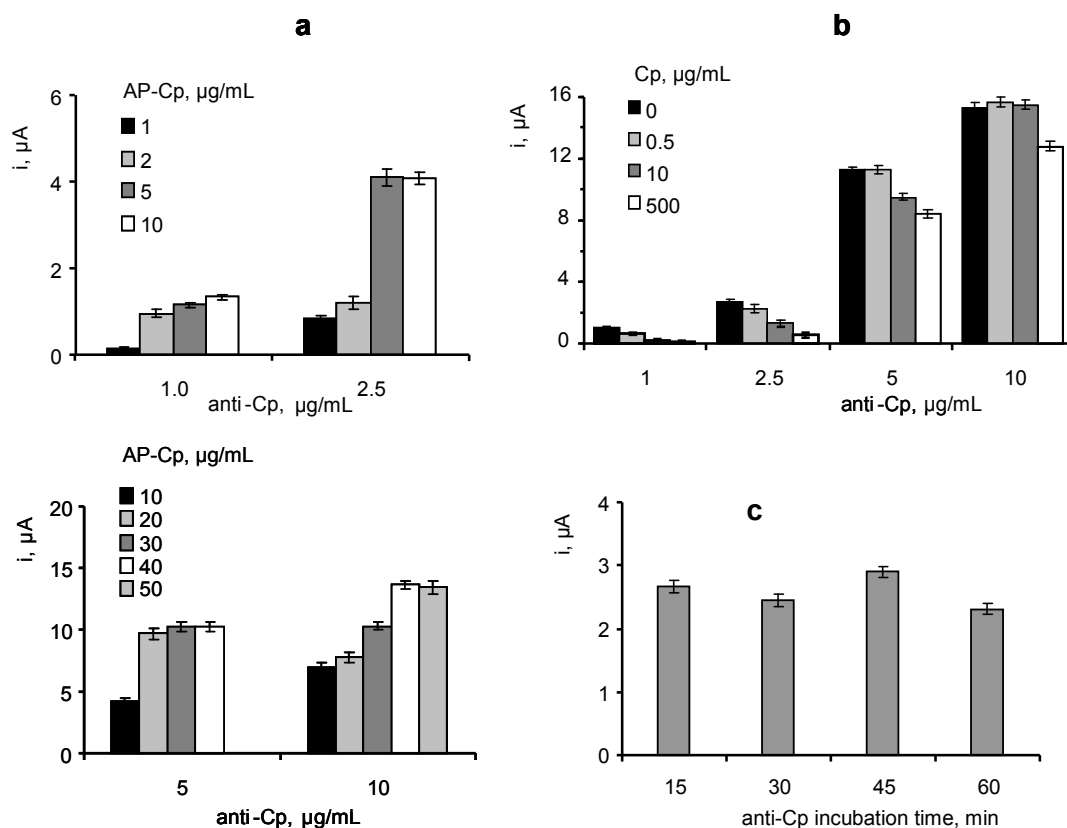
naphthylphosphate concentration on the DP voltammetric responses was evaluated over the 0.5-100 mM concentration range (Figure S2e). The peak current reached a higher value for 5 mM AP substrate concentration which ensured that the enzyme reaction rate depended only on AP concentration. The time required for the AP enzyme reaction to proceed was also optimized (Figure S2f), with current values increasing with time in the 0 to 12 min hydrolysis time range checked. As a compromise between sensitivity and a short time of analysis, five minutes were selected for further work.

Similarly to that discussed previously, variables involved in the analytical performance of the immunosensor design using anti-Cp-Biotin-Strept-MBs were also optimized. Thus, the loading of biotinylated antibody onto the Strept-MBs was evaluated by checking the DP voltammetric response obtained for different immunosensors constructed by suspending 30  $\mu\text{g}$  of Strept-MBs in 25  $\mu\text{L}$  of anti-Cp-Biotin solution prepared in the 1–20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration range, and using 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AP-Cp and an incubation time of one hour. Figure S3a shows as the  $i_p$  values measured in the absence of Cp increased sharply with the antibody loading up to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , reaching a nearly saturated response for larger loadings. Therefore, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp-Biotin was selected for further work. The concentration of AP-Cp was also optimized by measuring with different anti-Cp-Biotin-Strept-MBs immunosensors prepared with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp-Biotin upon incubation in 25  $\mu\text{L}$  of AP-Cp solutions with concentrations ranging between 0.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As it can be seen in Figure S3b,  $i_p$  showed a sharp increase between 0.5 and 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  while the increase was much smoother for higher AP-Cp concentrations. Moreover, Figure S3b also shows that for 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ap-Cp the competition between Cp and AP-Cp allowed a noticeable change in the measured current to be obtained for different analyte concentrations. Therefore, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp-Biotin and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AP-Cp concentrations were selected for further work. The incubation time of anti-Cp-Biotin onto Strept-MBs was also optimized. As Figure S4c shows, 15 min demonstrated to be

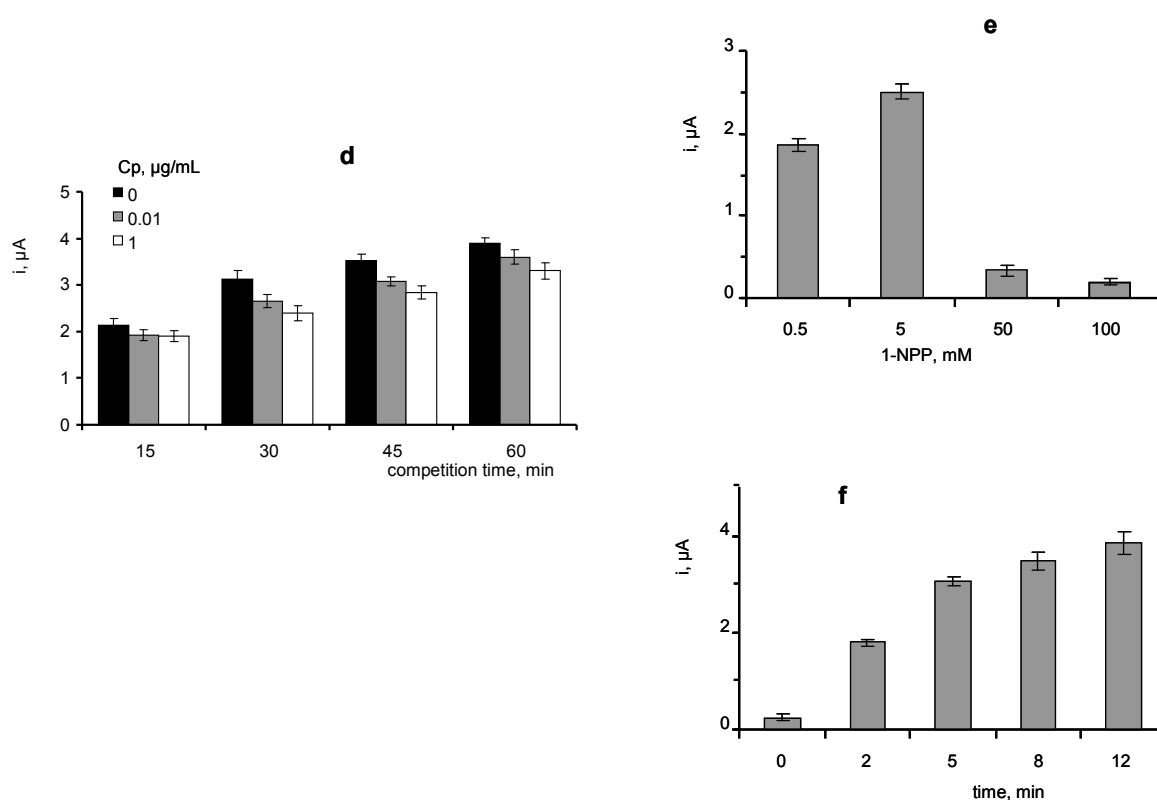
sufficient to reach a maximum in the voltammetric response. Similarly to that occurring with the Protein A-MBs configuration, a 30 min incubation time between Cp and AP-Cp was selected to allow competition providing the maximum current difference with respect to the signal measured in the absence of Cp (Figure S4d). Also, the influence of 1-naphthylphosphate concentration and the time required for the AP enzyme reaction to proceed, on the voltammetric responses were evaluated over the 0.5 to 100 mM 1-naphthylphosphate (Figure S4e) and 0 to 12 min (Figure S4f), respectively. The results obtained were similar to those commented for the anti-Cp-Protein A-MBs configuration and a 5 mM substrate concentration and five minutes were selected as optimized values.

## References

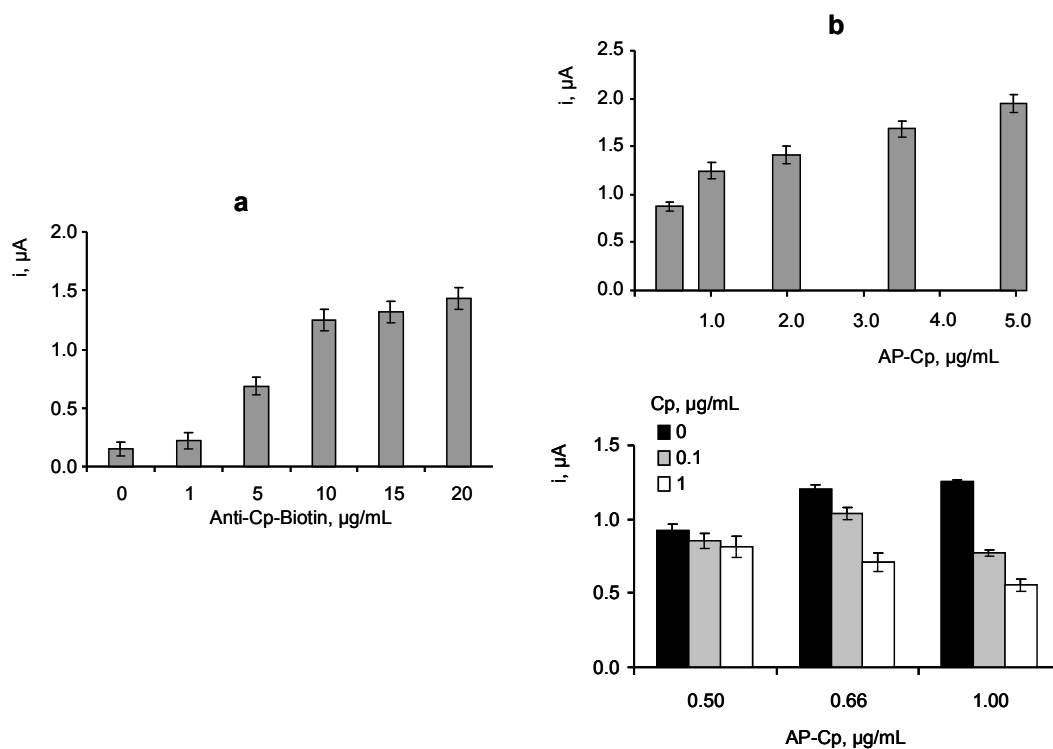
- [1] A. Ruth, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001** *15*, 1-16.



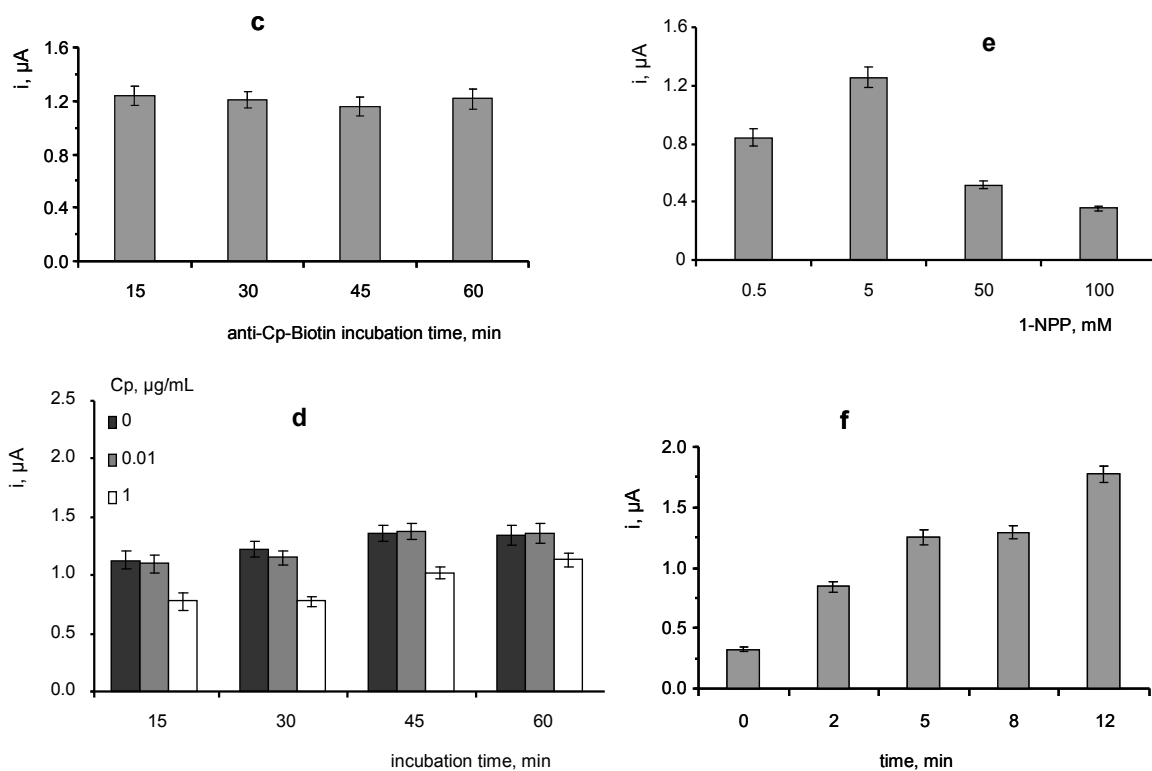
**Figure S1.** Effect of the anti-Cp loading onto Protein A-MBs for various AP-Cp concentrations in the absence of Cp (a), for different Cp concentrations at the Ap-Cp concentration corresponding to the saturation level (b), and effect of the incubation time of anti-Cp onto Protein A-MBs (c). See the text for additional information.



**Figure S2.** Effect of the time needed for competition on the DPV response measured with immunosensors prepared using Protein A-MBs (d); effect of the 1-naphthylphosphate concentration (e), and effect of the time required for the AP enzyme reaction to proceed (f). See the text for additional information.



**Figure S3.** Effect of anti-Cp-Biotin loading onto Strept-MBs for 1  $\mu\text{g/mL}$  AP-Cp (a); effect of AP-Cp concentration for 10  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp-Biotin loading on the DPV response measured in the absence of Cp with immunosensors prepared using Strept-MBs, and effect of the AP-CP concentration on the competitive responses obtained with the immunosensors for various Cp concentrations using 10  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp-Biotin (b). See the text for additional information.

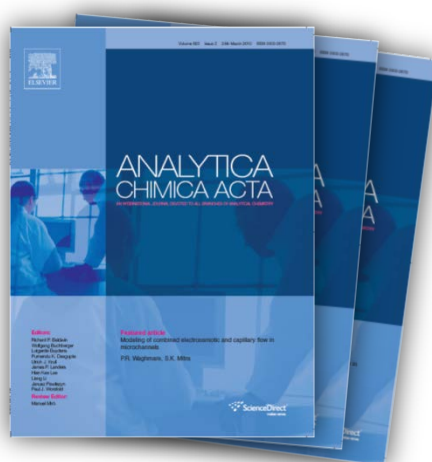


**Figure S4.** Effect of the incubation time of anti-Cp-Biotin onto Strept –MBs (c); effect of the time needed for competition between Cp and AP-Cp (d); effect of the 1-naphthylphosphate concentration (e), and effect of the time required for the AP enzyme reaction to proceed (f). See the text for additional information.



## Electrochemical immunosensor for rapid and sensitive determination of estradiol

Irene Ojeda, Judith López-Montero, María Moreno-Guzmán, Bruno Campos Janegitz, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel Pingarrón







# Electrochemical immunosensor for rapid and sensitive determination of estradiol

I. Ojeda<sup>a</sup>, J. López-Montero<sup>a</sup>, M. Moreno-Guzmán<sup>a</sup>, B.C. Janegitz<sup>b</sup>, A. González-Cortés<sup>a</sup>, P. Yáñez-Sedeño<sup>a,\*</sup>, J.M. Pingarrón<sup>a</sup>

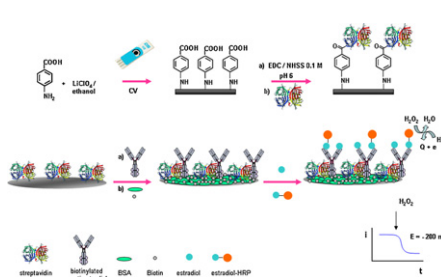
<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

## HIGHLIGHTS

- ▶ An electrochemical immunosensor for estradiol based on grafted SPCEs was developed.
- ▶ Grafting of p-aminobenzoic acid on SPCEs and streptavidin covalent binding was used.
- ▶ A low LOD, 0.77 pg mL<sup>-1</sup>, and a wide linear range, 1.0–250 pg mL<sup>-1</sup>, were obtained.
- ▶ Validation was made by analyzing human serum and urine.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 16 May 2012

Received in revised form 28 June 2012

Accepted 2 July 2012

Available online 7 July 2012

### Keywords:

Estradiol  
Electrochemical immunosensor  
Screen-printed electrodes  
Serum  
Urine

## ABSTRACT

This work describes the preparation of an electrochemical immunosensor for estradiol based on the surface modification of a screen printed carbon electrode with grafted p-aminobenzoic acid followed by covalent binding of streptavidin (Strep) and immobilization of biotinylated anti-estradiol (anti-estradiol-Biotin). The hormone determination was performed by applying a competitive immunoassay with peroxidase-labelled estradiol (HRP-estradiol) and measurement of the amperometric response at  $-200$  mV using hydroquinone (HQ) as redox mediator. The calibration curve for estradiol exhibited a linear range between 1 and 250 pg mL<sup>-1</sup> ( $r=0.990$ ) and a detection limit of 0.77 pg mL<sup>-1</sup> was achieved. Cross-reactivity studies with other hormones related with estradiol at physiological concentration levels revealed the practical specificity of the developed method for estradiol. A good reproducibility, with RSD = 5.9% ( $n=8$ ) was also observed. The operating stability of a single bioelectrode modified with anti-estradiol-Biotin-Strep was nine days when it was stored at 8 °C under humid conditions between measurements. The developed immunosensor was applied to the analysis of certified serum and spiked urine samples with good results.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The hormone estradiol (17 $\beta$ -estradiol, E2) is a natural estrogen with relevant roles in various physiological processes and with particular impact on the reproductive and sexual functioning. The quantification of estradiol levels in serum and urine is important in various clinical evaluations including investigations of fertility treatments, post-menopausal status, hyperandrogenism and breast cancer [1]. Furthermore, the determination of estro-

diol is also of interest in environmental monitoring because of its high endocrine disrupting potency, and the extensive use of therapies with synthetic hormone in humans and other animals [2]. Gas chromatography [3,4] and high performance liquid chromatography [5,6] have been used for the determination of estradiol and related compounds in biological, pharmaceutical, and water samples. Also, electrochemical methods involving voltammetry [7,8] and chronoamperometry [9,10] were reported. Furthermore, selective and sensitive methods based on the development of enzyme [11] and DNA biosensors [12,13] have also been described.

Clinical monitoring of estradiol has been commonly performed by applying immunoassay methodologies using various detection

\* Corresponding author. Fax: +34 913944329.

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



**Amperometric immunosensor for the  
determination of ceruloplasmin in human serum  
and urine based on covalent binding to carbon  
nanotubes-modified screen-printed electrodes**

*Belit, Garcinuño Píndado, Irene Ojeda, María Moreno-Guzmán,  
Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel  
Píngarrón*







ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

# Amperometric immunosensor for the determination of ceruloplasmin in human serum and urine based on covalent binding to carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes



B. Garcinuño, I. Ojeda, M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés,  
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 31 July 2013

Received in revised form

26 September 2013

Accepted 3 October 2013

Available online 9 October 2013

### Keywords:

Ceruloplasmin

Electrochemical immunosensor

Carbon nanotubes

Human serum

Urine

## ABSTRACT

A novel electrochemical immunosensor for the determination of ceruloplasmin (Cp) in human serum and urine is reported. The immunosensor configuration involves an indirect competitive immunoassay implying covalent immobilization of Cp on activated carboxylic groups at carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes (CNTs/SPE). After Cp immobilization and reaction between the target analyte and anti-ceruloplasmin antibodies in solution, the remaining non-conjugated antibody is attached on the Cp-CNTs modified electrode. Monitoring of Cp is performed by means of a secondary antibody labeled with peroxidase (HRP-anti-IgG) and measurement of the amperometric current resulting from the addition of hydrogen peroxide in the presence of hydroquinone as the redox mediator. The experimental variables affecting the analytical performance of the immunosensor were optimized. Calibration curves for Cp provided a linear range between 0.07 and 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.997$ ). The limit of detection achieved was 21 ng/mL. These analytical characteristics allow the immunosensor to be successfully used for the determination of Cp in spiked human serum and urine at various concentration levels.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The efficient, reliable, rapid and low cost monitoring of disease biomarkers is an analytical challenge involving several technological fields. A relevant example in this field regards with the development of electrochemical immunosensors, an area exhibiting an enormous evolution in recent years which has been possible mainly due to the irruption of nanomaterials. The choice of a suitable electrode platform capable of providing the best conditions for a stable and oriented immobilization of immunoreagents while giving rise to appropriate electroanalytical signals, is a crucial step in the design of electrochemical immunosensors useful for applications to real sample analysis. Carbon nanotubes (CNTs) have been widely used in the design of electrochemical sensors and enzyme biosensors, although not to the same extent in the case of immunosensors [1,2]. Nevertheless, in recent years various strategies for antibodies immobilization on CNTs have been proposed [3]. Hydrophobic adsorption, the simplest alternative, has various drawbacks related with the scarce stability of protein coating and the fast decay in biological activity of biomolecules. Furthermore, lack of orientation also results in a reduced

capacity for antigen binding. Efforts have been made to find methods capable of achieving stable and oriented immobilization of antibodies. Among them, those involving carboxylation of carbon nanotubes followed by covalent binding with amine groups of biomolecule have demonstrated to be particularly useful [3,4]. This is because it does not require antibody chemical modification or derivatization and the simple methodology used not need either the application of several steps, which implies a reduction in the consumption of time and reagents.

Ceruloplasmin (Cp) is an  $\alpha_2$ -glycoprotein containing more than 95% copper present in blood. It belongs to the group of inflammation-sensitive proteins (ISPs) and is considered as an important cardiovascular diseases risk factor. It can be used as a biomarker for obesity and correlated positively with body fat mass or weight gains [5]. High serum levels of Cp have been found in patients with central obesity, being also related with serum triglyceride and cholesterol levels [6]. Increased urinary excretion of Cp also predicts future development of microalbuminuria [7]. On the other hand, low levels of Cp ( $< 20 \mu\text{g/mL}$  in adults) are associated with Wilson's disease, an infrequent cause of chronic liver disease [8,9] produced by an autosomal recessive disorder of copper accumulation.

Various colorimetric methods based on the oxidase activity of Cp using p-phenylenediamine (PPD) or dianisidine (3,3'-dimethoxy benzidine) as substrates [10–12] were reported to determine Cp. Kinetic methods using  $\text{Fe}^{2+}$  were also described [13,14]. Another

\* Corresponding author.

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

## Supplementary material

### 1. Optimization of variables affecting the performance of HRP-anti-IgG-anti-Cp-Cp-CNTs/SPE.

#### *a) Effect of the working medium and pH value on Cp immobilization onto CNTs/SPE*

In order to select the appropriate working medium for the Cp covalent immobilization on the activated carboxyl groups in the CNTs/SPE surface, a comparative study was performed at pH 7.4 and 6.0 (in phosphate buffer), and at pH 5.0 (in MES buffer), these media being those used for the preparation of both Cp and EDC/NHSS solutions. Figure S1a compares, at each pH value, the responses of HRP-anti-IgG-anti-Cp-Cp-CNTs/SPE immunosensors prepared by immobilizing 50  $\mu\text{g/mL}$  Cp (specific responses) with those measured at a HRP-anti-IgG-anti-Cp-CNTs/SPE, i.e. with no immobilized Cp (unspecific responses). In all cases, the amperometric responses were measured according to the procedure described in the Experimental section, in the absence of Cp analyte and with 10  $\mu\text{L}$  of 7.5  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp and 10  $\mu\text{L}$  of 1:750 diluted HRP-anti-IgG. The incubation time used was 45 min. As it can be observed, unspecific responses were very small in all cases, but the highest specific response was obtained when the immobilization was carried out at pH 5.0, probably because this value is lower than the isoelectric point of Cp. It has been seen that, at these experimental conditions, proteins are electrostatically pre-adsorbed onto the rests of non-activated but dissociated carboxylic groups which improved the covalent binding [1]. Accordingly, pH 5.0 was selected for further studies.

*b) Effect of the Cp loading on the CNTs/SPE*

This effect was evaluated by taking 10  $\mu\text{L}$  aliquots of different Cp solutions prepared in the 20 to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration range and applying the procedure described in 2.3.1. Amperometric measurements obtained in the absence of Cp analyte and with 10  $\mu\text{L}$  of 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-Cp and 10  $\mu\text{L}$  of 1:750 diluted HRP-anti-IgG, are shown in Figure S1b. As it can be observed, the immunosensor response increased with increasing immobilized Cp up to 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and then levelled off. These results indicated that such concentration is sufficient to saturate the activated carboxylic groups on the CNTs/SPE, and therefore, it was chosen to accomplish the immunosensor preparation.

*c) Optimization of the blocking step*

In order to avoid or minimize non-specific binding of immunoreagents on the electrode surface, blocking steps with BSA or casein were assayed. The nature of the blocking agent, its concentration, and the incubation time employed to block the free sites on the CNTs/SPE surface (unspecific responses) or Cp-CNTs/SPE (specific responses) were optimized. BSA and casein were tested as the blocking agents using solutions with different concentrations: 2% and 5% (BSA) and 1% and 2% (casein). The protocol consisted of adding 10  $\mu\text{L}$  of each blocking solution on the CNTs/SPE or Cp-CNTs/SPE electrode, and allowing incubation for a pre-established time of 45 min. The obtained results are shown in Figure S1c. As it can be observed, the best blocking conditions, with lower unspecific and higher specific responses implied the use of a 2% casein solution.

*d) Effect of the anti-Cp concentration*

The concentration of anti-Cp required to react with Cp was optimized by comparing the responses obtained with the HRP-anti-IgG-anti-Cp-Cp-CNTs/SPE (1) in the presence and (2) in absence of Cp analyte. In the first case, solutions containing anti-Cp in the 0.75 to 10.0  $\mu\text{g/mL}$  concentration range were mixed with 30  $\mu\text{g/mL}$  Cp and allowed reacting for 20 min; thereafter, 10  $\mu\text{L}$  of the resulting solution were incubated for 45 min onto the Cp-CNTs/SPE. In the latter case, 10  $\mu\text{L}$  aliquots of each anti-Cp solution were directly dropped onto the Cp-CNTs/SPE. The obtained results are summarized in Figure S2a. In the absence of Cp, the responses reached the largest values from a 2.5  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp concentration, this value being most likely the anti-Cp concentration needed to saturate the immobilized Cp on the electrode surface. Furthermore, the largest difference between the currents measured in the presence or absence of Cp was also obtained for that anti-Cp concentration. Therefore, 2.5  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp was selected for further work.

*e) Effect of the time and temperature used in the reaction between Cp and anti-Cp*

The reaction time between Cp and anti-Cp was also optimized. In order to do that, a mixture of 50  $\mu\text{g/mL}$  Cp and 2.5  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp was kept under stirring in an eppendorf tube for times taking between 10 and 45 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . After this, 10  $\mu\text{L}$  aliquots of the reaction solutions were dropped onto the Cp-CNTs/SPE and allowing to incubate for 45 min. The results obtained (not shown) revealed that the measured current was smaller for a reaction time of 20 min was used. This time also allowed the largest difference between the signals in the presence and absence of Cp in solution to be obtained. Moreover, the effect of the affinity reaction temperature was also tested at three different values: 4  $^{\circ}\text{C}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$ . The results obtained are displayed in

Figure S2b and revealed that the best results were achieved for the lower temperature, most likely due to the higher stability of the antibody and the Cp at this temperature. All these results led us to select a time of 20 min and a temperature of 4 °C to carry out the reaction between Cp and anti-Cp.

*f) Effect of the incubation time of anti-Cp on the Cp-CNTs/SPE*

The results obtained in this study are given in Figure S2c. The responses of the immunosensor were compared by applying incubation times for anti-Cp ranging between 15 and 60 min both in the presence of 50 µg/mL Cp and in absence of analyte. As it can be seen, an incubation time of 30 min provided the largest difference between both current values.

*g) Effect of the concentration and incubation time of HRP-anti-IgG Cp on anti-Cp-Cp-CNTs/SPE*

Different dilutions from the HRP-anti-IgG commercial product were made in the 1/200 to 1/750 range in order to select the best value for the optimum functioning of immunosensor. As it can be observed in Figure S2d, the largest dilution provided the largest difference between the currents measured in the absence and in the presence of Cp analyte. When using low HRP-anti-IgG dilutions, non-specific adsorption of the labeled antibody on the electrode surface provoked high currents in the presence of the analyte (even larger than in its absence). On the other hand, the incubation time for HRP-anti-IgG on the anti-Cp-Cp-CNTs/SPE was checked between 15 and 60 min with a 1:750 HRP-anti-IgG dilution. The obtained results (Figure S2e) show that current was practically stable from 30 min, this incubation time being then selected for the preparation of the immunosensor.

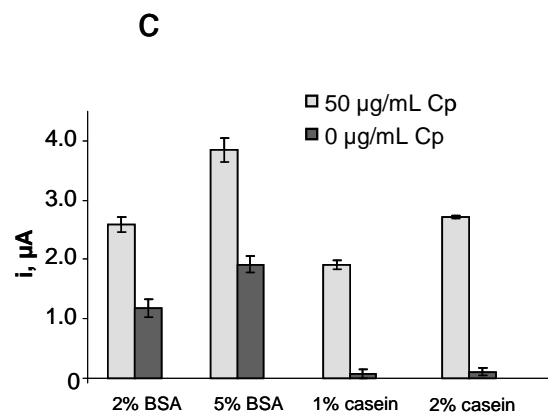
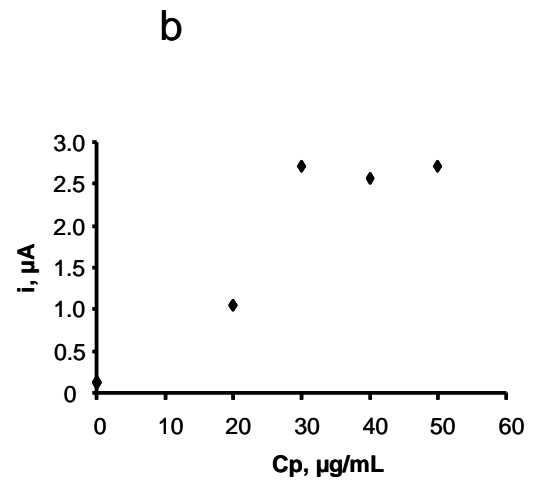
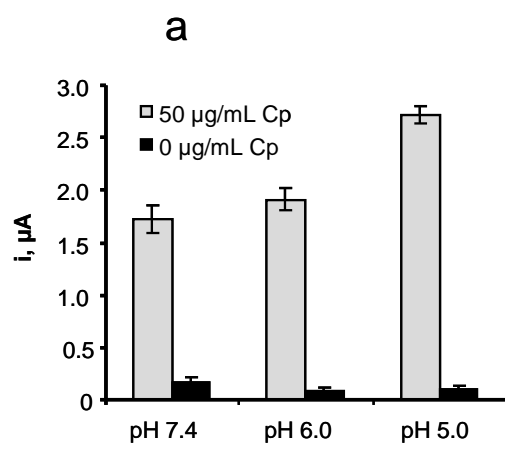
## REFERENCES

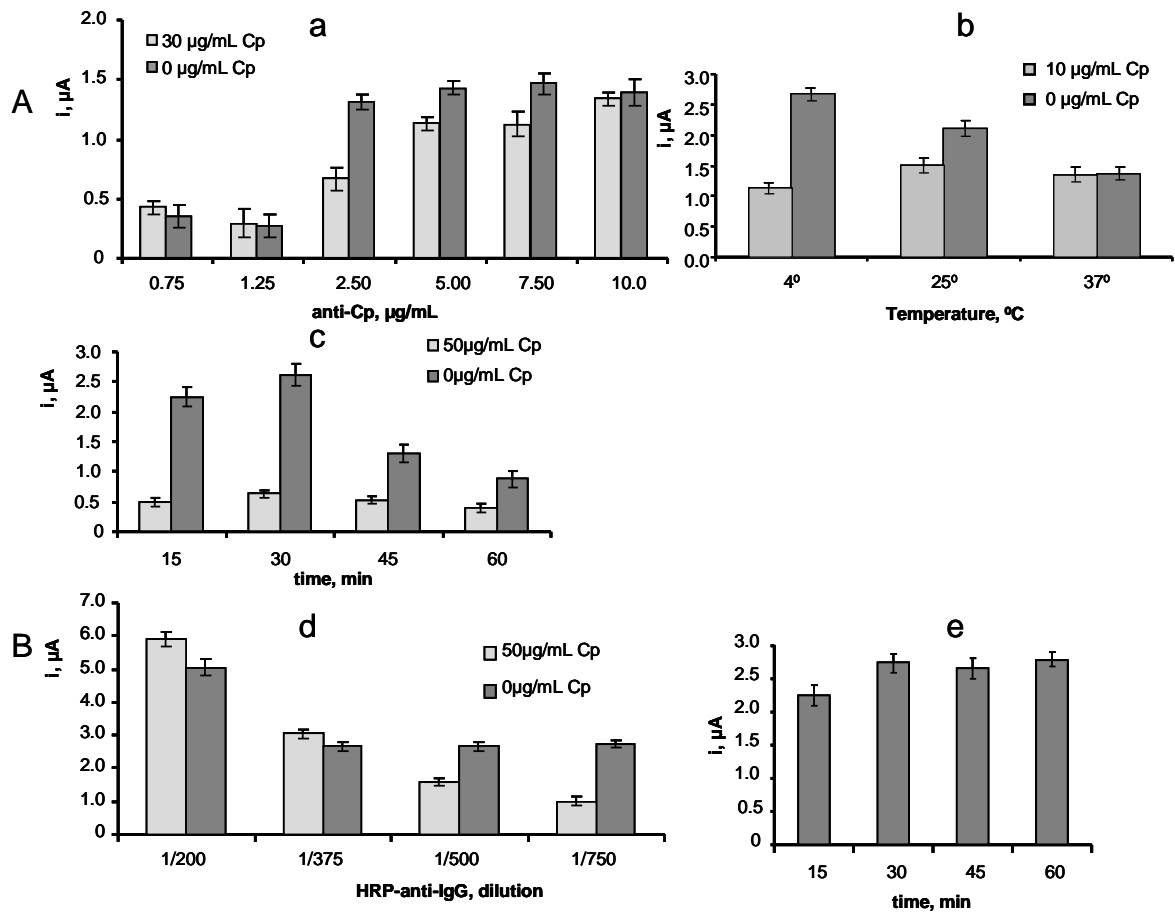
1. S. Puertas, M. G. Villa, E. Mendoza, C. Jiménez-Jorquera, J. de la Fuente, C. Fernández-Sánchez, V. Grazú, *Biosens. Bioelectron* 43 (2013) 274–280.

## FIGURES CAPTIONS

**Figure S1.** (a) Effect of the working medium and pH used in the Cp immobilization step onto CNTs/SPE surface in the presence of 50  $\mu\text{g/mL}$  immobilized Cp, or in the absence of immobilized Cp, (b) effect of the amount of immobilized Cp on the CNTs/SPE surface in the absence of Cp analyte and (c) effect of the blocking step on the responses of the as prepared immunosensors. 7.5  $\mu\text{g/mL}$  anti-Cp; 1:750 diluted HRP-anti-IgG; the incubation time for each step was 45min.

**Figure S2.-** A: Effect of the anti-Cp concentration in the presence (30  $\mu\text{g/mL}$ ) and in the absence of Cp in solution (a), of the temperature incubation of anti-Cp in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$  Cp or in absence of Cp (b) and of the incubation time for anti-Cp on the Cp-CNTs/SPE in the absence or in the presence of 50  $\mu\text{g/mL}$  Cp (c) on the immunosensor response; 1:750 diluted HRP-anti-IgG; incubation time, 45min. B: Effect of the HRP-anti-IgG loading on the anti-Cp-Cp-CNTs/SPE (d) and the corresponding incubation time (e) on the immunosensor response in the absence or in the presence of 50  $\mu\text{g/mL}$  Cp; anti-Cp, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ; immobilization time, 45min







# **Carbon Nanohorns as a Scaffold for the Construction of Disposable Electrochemical Immunosensing Platforms. Application to the Determination of Fibrinogen in Human Plasma and Urine**

*Irene Ojeda, Belit Garcinuño, María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño and José Manuel Pingarrón*





# Carbon Nanohorns as a Scaffold for the Construction of Disposable Electrochemical Immunosensing Platforms. Application to the Determination of Fibrinogen in Human Plasma and Urine

Irene Ojeda,<sup>†</sup> Belit Garcinuño,<sup>†</sup> María Moreno-Guzmán,<sup>†</sup> A. González-Cortés,<sup>†</sup> Masako Yudasaka,<sup>‡</sup> Sumio Iijima,<sup>§</sup> Fernando Langa,<sup>||</sup> Paloma Yáñez-Sedeño,<sup>†</sup> and José M. Pingarrón<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040-Madrid, Spain

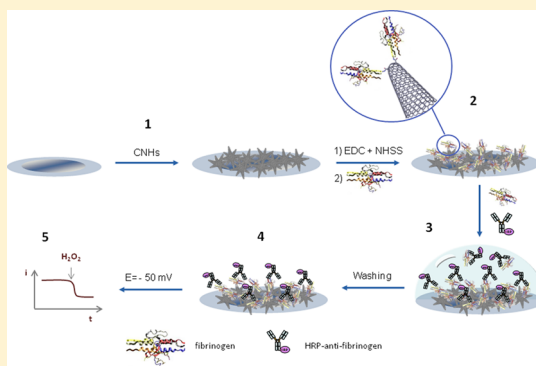
<sup>‡</sup>Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial and Technology, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

<sup>§</sup>Department of Physics, Meijo University, Shiogamaguchi, Tenpaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan

<sup>||</sup>Instituto de Nanociencia, Nanotecnología y Materiales Moleculares (INAMOL), Universidad de Castilla-La Mancha, 45071-Toledo, Spain

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** We describe in this work a novel electrochemical immunosensor design making use of carbon nanohorns (CNHs) as a scaffold for the preparation of disposable immunosensing platforms for the determination of fibrinogen (Fib). The approach involved the immobilization of Fib onto activated CNHs deposited on screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and the implementation of an indirect competitive assay using anti-Fib labeled with horseradish peroxidase (HRP) and hydroquinone (HQ) as the redox mediator. Both CNHs and the Fib-CNHS covalent assembly were characterized by microscopic and electrochemical techniques. The different variables affecting the analytical performance of the amperometric immunosensing strategy were optimized. The calibration plot for Fib allowed a range of linearity between 0.1 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2 = 0.994$ ) and a detection limit of 58 ng/mL to be achieved. The Fib-CNHS/SPCEs exhibited an excellent storage stability of at least 42 days. The developed immunosensor provides, in general, an analytical performance better than that reported for other Fib immunosensors and commercial ELISA kits. This simple and relatively low cost immunosensor configuration permitted the sensitive and selective determination of Fib in human plasma and urine.



Carbon nanohorns (CNHs) consist of single-wall graphene sheets having tubule structure with diameters of 2–5 nm and length 40–50 nm with conical-shaped tips. Several thousand CNHs assemble to form quasispherical aggregates shaped like a dahlia flower. CNHs are produced by laser ablation of pure graphite in the absence of metallic catalysts.<sup>1</sup> The spherical aggregate structure enabled easy dispersion in liquids, and there was no need for a metal removal purification step. These advantages of CNHs over the other nanocarbons have promoted interest in the use of this material in various applications.<sup>2,3</sup> CNHs with pseudocylindrical forms have bumps and dips where pentagonal and heptagonal rings exist.<sup>4</sup> The number of structure defects was larger than those of straight-shaped carbon nanotubes. Such defects are easily oxidized and holes are opened,<sup>4</sup> generating abundant oxygenated groups,<sup>5</sup> which is also attractive to various applications. By opening holes, the inner space becomes accessible, and the specific surface area is enlarged from about 300 m<sup>2</sup>/g to 1400 m<sup>2</sup>/g.<sup>6</sup>

CNH-modified electrodes have been prepared to observe direct electron transfer from proteins. For example, glucose

oxidase (GOx) immobilized onto a Nafion-CNHS film displayed cyclic voltammograms showing a pair of redox peaks at a formal potential of  $-0.453$  V. A GOx biosensor based on this configuration was prepared for the determination of glucose in a linear range from 0 to 6.0 mM using ferrocene monocarboxylic acid as the redox mediator.<sup>7</sup> More recently, the same authors prepared a CNH film functionalized non-covalently with poly(sodium 4-styrenesulfonate) for the immobilization of myoglobin and reported the fabrication of an electrochemical biosensor showing direct electrochemistry and electrocatalytic ability toward the reduction of hydrogen peroxide.<sup>8</sup> Direct electron transfer of soybean peroxidase (SBP) adsorbed on CNH-modified electrodes along with effective electrocatalysis on the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were also observed.<sup>9</sup> Moreover, a biosensor using synthesized gold nanoparticles/CNHs hybrids and xanthine oxidase immobilized on a platinum

Received: May 6, 2014

Accepted: July 7, 2014

Published: July 7, 2014

## **Supporting Information.**

### **- Optimization of the experimental variables involved in the performance of the electrochemical immunosensing approach**

*- Effect of the CNH loading onto the SPCE*

*- Effect of the Fib loading immobilized on the activated CNHs*

*- Figure S1*

*- Optimization of the blocking step*

*- Figure S2*

*- Effect of the HRP-anti-Fib concentration*

*- Figure S3*

*- Effect of a pre-incubation period of HRP-anti-Fib and the target Fib in the mixture solution*

*-Effect of the potential value applied for the amperometric detection*

*- Figure S4*

*-Figure S5*

*-Table S1*

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

*- Effect of the CNH loading onto the SPCE*

This effect was evaluated by dropping 10- $\mu$ L aliquots of different CNHs aqueous dispersions prepared with 0.25, 0.5 or 1.0 mg/mL carboxylated CNHs on the SPCE surface and applying the procedure described in section 2.4.1 both in the absence and in the presence of 50  $\mu$ g/mL immobilized Fib. The immunoreactions were accomplished by dropping 10  $\mu$ L of a 2  $\mu$ g/mL HRP-anti-Fib solution and allowing incubation for 30 min. Amperometric measurements were carried out by dropping 45  $\mu$ L of a 1 mM HQ solution on the electrode surface and applying a potential value of -0.05 V followed by the addition of 5  $\mu$ L of a 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. As it can be observed in Figure S1a, the current in the presence of immobilized Fib decreased slightly with increasing the CNHs loading, although a non conclusive trend could be deduced considering the measurements variability. This comment is also valid for the measurements made in the absence of immobilized Fib. Nevertheless, Fig. S1a seems to indicate that a 0.5 mg/mL CNHs loading produced the best signal-to-blank current ratio as well as the smaller response variability and therefore it was selected to prepare the modified CNHs/SPCEs. Under this experimental conditions, the specific response of the bioelectrode was around 16 times larger than the nonspecific interactions.

*- Effect of the Fib loading immobilized on the activated CNHs*

The influence of the immobilized Fib loading was evaluated by using 10  $\mu$ L aliquots of different Fib solutions prepared in the 0 to 100  $\mu$ g/mL concentration range and applying the procedure described in section 2.4.1. The amperometric measurements were made using 10  $\mu$ L of 0.5  $\mu$ g/mL HRP-anti-Fib. Figure S1b showed as the measured current increased with the Fib loading

up to 75  $\mu\text{g/mL}$  and decreased for larger Fib concentration. These results indicated that 75  $\mu\text{g/mL}$  Fib was sufficient to saturate the activated carboxylic groups on the CNHs/SPCE, and therefore, it was chosen for subsequent work.

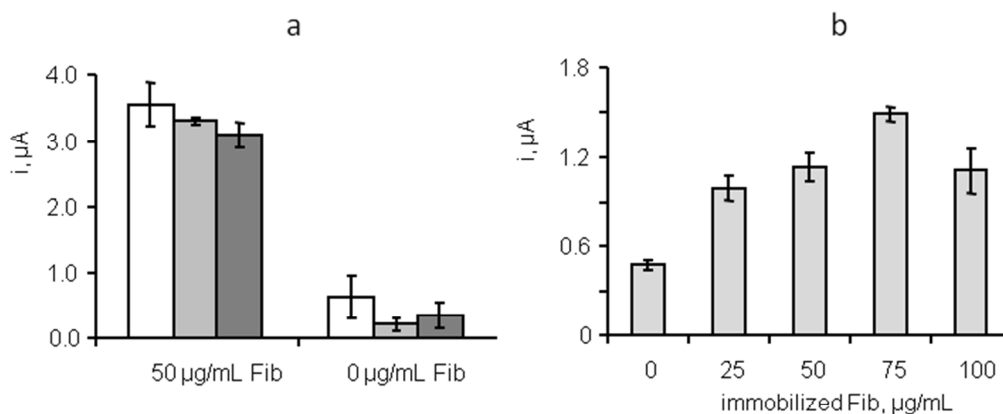


Figure S1.- Amperometric responses measured with HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE electrodes as a function of: (a) the CNHs loading onto the SPCE: 10  $\mu\text{L}$  of aqueous 0.25 (white), 0.5 (light grey) and 1 mg/mL (dark grey) carboxylated CNHs dispersion; 10  $\mu\text{L}$  2  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib, incubation time 30 min; (b) immobilized Fib loading: 10  $\mu\text{L}$  of aqueous 0.5 mg/mL CNHs dispersion; 10  $\mu\text{L}$  0.5  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib, incubation time 30 min; blocking step with 10  $\mu\text{L}$  2% casein, 45 min; 1 mM HQ; 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $E_{\text{det}} = -200$  mV. See the text for other conditions.

#### - Optimization of the blocking step

In order to avoid or minimize non-specific adsorptions of immunoreagents on the electrode surface, various studies concerning blocking of the electrode surface remaining unmodified sites were carried out. The nature of the blocking agent, its concentration, and the corresponding

incubation time were optimized. Casein, BSA and semi-skimmed milk were tested as the blocking agents using solutions with different concentrations: 2% casein, 2% BSA and 50% milk prepared in 0.1 M PBS pH 7.4. The protocol consisted of adding 10  $\mu$ L of each blocking solution on the CNHs/SPCE or Fib-CNHs/SPCE, and allowing incubation for a pre-established time of 45 min. The obtained results are shown in Figure S2a. The larger specific-to-unspecific response ratio (approx. 6) was attained using a 50% milk solution. Figure S2b shows the effect of the milk dilution factor. As it can be seen, no significant differences in the above mentioned ratio were observed for dilutions between 1/10 to 1/1.5 dilution factors with the PBS buffer, the best specific response of the immunosensor together with the lowest unspecific signal was achieved for a 1/4 dilution. Finally, the incubation time for blocking was also optimized with the results depicted in Figure 2c. 30 min was selected as the optimal value since the reproducibility of the measurements was better and the specific-to-unspecific responses ratio (about 7) was similar to that obtained for 15 min.

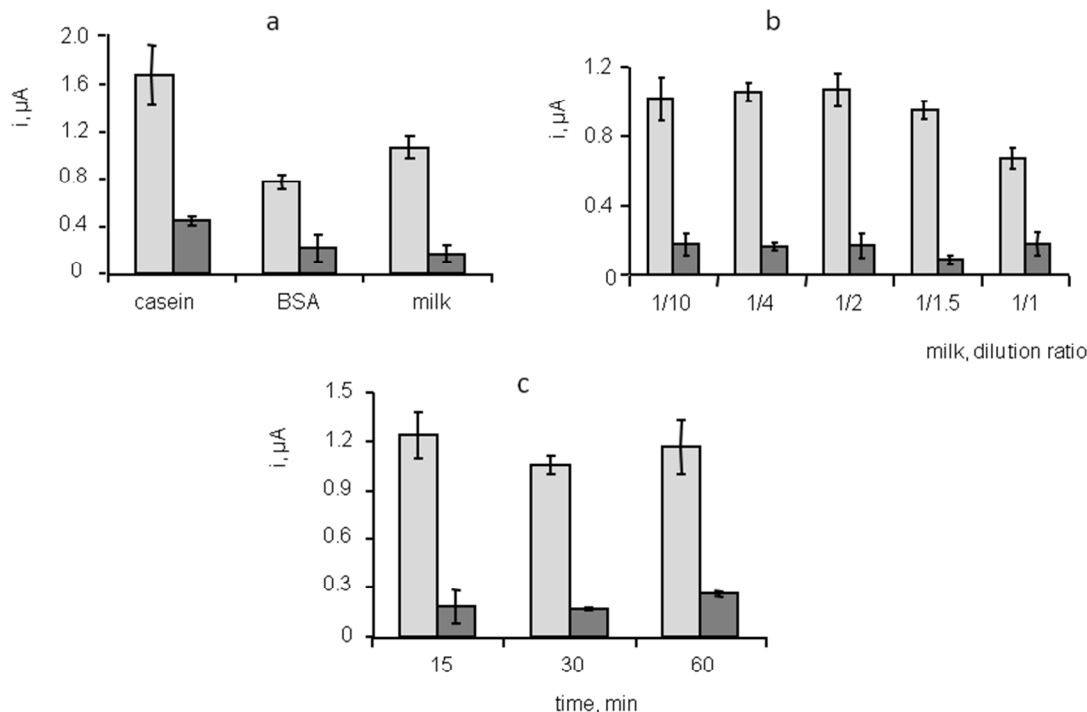


Figure S2.- Effect on the amperometric response obtained with HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensors of: (a) the type of blocking agent: 10  $\mu\text{L}$  of 2% casein, 2% BSA or 50% semi-skimmed milk in 0.1 M PBS of pH 7.4; (b) the milk dilution factor, and (c) the incubation time for blocking using 1/4 diluted milk. 10  $\mu\text{L}$  of aqueous 0.5 mg/mL CNHs dispersion; 75  $\mu\text{g/mL}$  (light grey) or 0  $\mu\text{g/mL}$  (dark grey) immobilized Fib, 30 min; 10  $\mu\text{L}$  0.5  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib, 30 min; 1 mM HQ; 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $E_{\text{det}} = -200$  mV. See the text for other conditions.

*- Effect of the HRP-anti-Fib concentration*

The concentration of HRP-anti-Fib used in the indirect competitive assay was optimized by comparing the amperometric responses obtained with the HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensor in the presence and in the absence of target Fib. Solutions containing HRP-anti-

Fib in the 0.2 to 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration range were mixed with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fib and, thereafter, 10  $\mu\text{L}$  of the resulting solution were incubated for 30 min onto the Fib-CNHs/SPCE. When no target Fib was employed, 10  $\mu\text{L}$  aliquots of each HRP-anti-Fib solution were directly dropped onto the Fib-CNHs/SPCE. The obtained results are summarized in Figure S3a. In the absence of target Fib, the responses increased with the HRP-anti-Fib concentration as a consequence of the higher enzyme loading on the electrode surface. This behavior suggested that the binding positions of immobilized Fib were not saturated in the whole conjugate range tested. Furthermore, the largest difference between the current measured in the presence or absence of Fib analyte was observed for 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HRP-anti-Fib and, therefore, this concentration was selected for further work.

In order to substantiate this choice, the influence of the immobilized Fib loading was re-optimized. Standard 0, 1, 10 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fib solutions were measured with different HRP-anti-Fib-Fib-CNTs/SPCE immunosensors prepared with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HRP-anti-Fib and 17.5, 25 or 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  immobilized Fib. The results obtained (Figure S3b) showed that the best analytical performance was achieved when 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fib were immobilized. Under these conditions, significantly different analytical signals were obtained for the lower target concentrations making it possible to obtain calibration graphs with good sensitivity over a wide range of analyte concentrations.

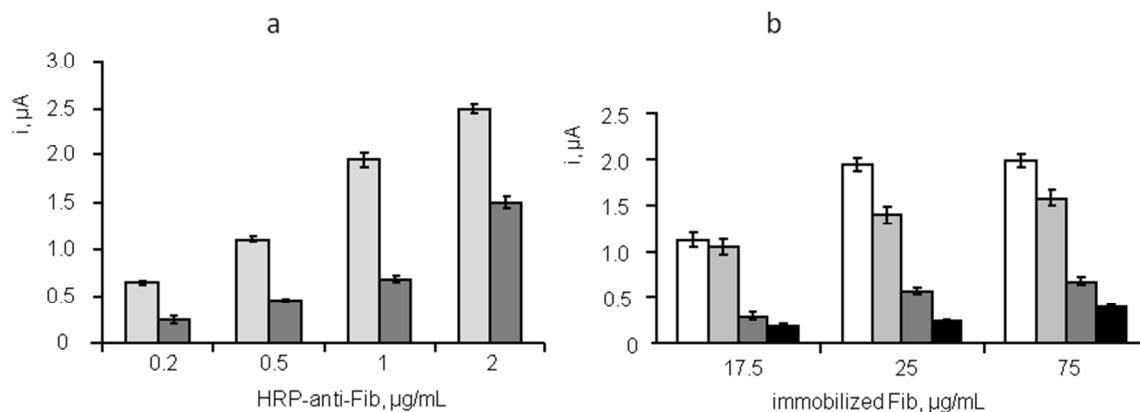


Figure S3.- Effect on the amperometric response of the HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensors of: (a) the HRP-anti-Fib concentration; 75  $\mu\text{g/mL}$  immobilized Fib; 10  $\mu\text{g/mL}$  (dark grey) or 0  $\mu\text{g/mL}$  (light grey) target Fib; (b) the Fib loading for 0  $\mu\text{g/mL}$  (white), 1  $\mu\text{g/mL}$  (light grey), 10  $\mu\text{g/mL}$  (dark grey), 100  $\mu\text{g/mL}$  (black) target Fib and 1  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib; 10  $\mu\text{L}$  of aqueous 0.5  $\text{mg/mL}$  CNHs dispersion; 1/4 diluted semi-skimmed milk, 30 min; 1  $\text{mM}$  HQ; 5  $\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $E_{\text{det}} = -200$   $\text{mV}$ . See the text for other conditions.

*- Effect of the pre-incubation period of HRP-anti-Fib and the target Fib on the mixture solution*

In order to evaluate the need for a pre-incubation time between HRP-anti-Fib and Fib on the Fib-CNHs/SPCE, a mixture of 10  $\mu\text{L}$  of 2  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib and 10  $\mu\text{L}$  of 20  $\mu\text{g/mL}$  Fib (or 0  $\mu\text{g/mL}$ ) was kept under stirring in an eppendorf tube for 30 min at 25  $^\circ\text{C}$ . Thereafter, 10  $\mu\text{L}$  aliquots of the reaction solutions were dropped onto the Fib-CNHs/SPCE and allowing incubation for further 30 min. Alternatively, 10  $\mu\text{L}$  of the mixture containing 1  $\mu\text{g/mL}$  HRP-anti-Fib and 10  $\mu\text{g/mL}$  Fib (or 0  $\mu\text{g/mL}$ ) were directly dropped onto the Fib-CNHs/SPCE and

incubated for 30 min. The amperometric measurements (not shown) revealed that no significant differences were observed by applying both procedures with similar differences between the signals in the presence and the absence of target Fib. Therefore, in order to simplify the whole protocol, the direct casting of the mixture solution containing both reagents was employed to perform the immunoassay.

*-Effect of the potential value applied for the amperometric detection*

In order to select the optimal detection potential value to be applied for the amperometric measurements, this variable was evaluated over the 0 to -200 mV range. The results are shown in Figure S4. The measured current increased as the potential became more negative with a levelling off from -50 mV which was selected for further work in order to improve the selectivity of the amperometric measurements.

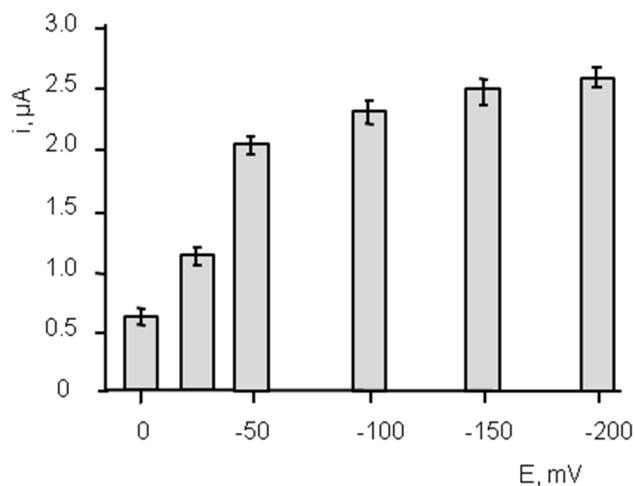


Figure S4.- Effect of the applied detection potential on the amperometric response of the HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensor: 10  $\mu\text{L}$  of aqueous 0.5 mg/mL CNHs dispersion; 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  immobilized Fib; 1/4 diluted semi-skimmed milk, 30 min; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HRP-anti-Fib; 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  target Fib; 1 mM HQ; 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . See the text for other conditions.

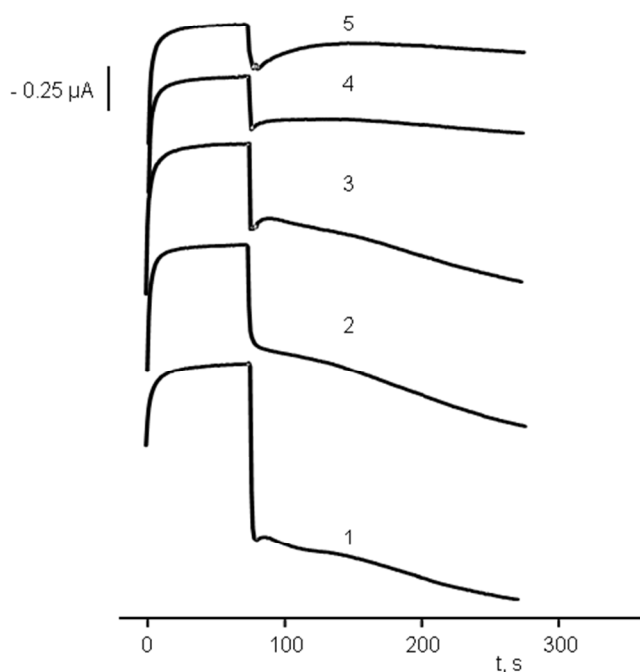


Figure S5.- Amperometric recordings used for the calibration plot of Fib at the HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensor: 1, 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 3, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 4, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 5, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . See the text for other conditions.

**Table S1.** Comparison of the analytical characteristics provided by the HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE immunosensor with those from other immunosensors and ELISA kits for Fib.

Immunoassay system	Characteristics	Range, $\mu\text{g/mL}$	LOD, $\text{ng/mL}$	Precision, RSD%	Samples	Assay time
HRP-Strept-Biotin-Fib-anti-FibNb-MBs/SPCE <sup>28</sup>	Direct competitive immunoassay between Fib and Biotin-Fib with anti-FibNb immobilized onto functionalized MBs/SPCE. Amperometric detection at -200 mV after immobilization of HRP-Strept and addition of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in the presence of HQ	0.5 - 250.0	490	6.0 (intra-assay)	certified plasma	3h 30 min
HRP-Strept-Biotin-anti-FibNb-Fib-MBs/SPCE <sup>28</sup>	Indirect competitive immunoassay with Fib immobilized onto functionalized MBs/SPCE. Amperometric detection at -200 mV after immobilization of Biotin-anti-FibNb and HRP-Strept, and addition of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in the presence of HQ	0.15 - 6.18	44	4.3 (intra-assay)	certified plasma	2h 10 min
Abcam 108842 human ELISA kit	Direct competitive immunoassay between Fib and Biotin-Fib with anti-Fib immobilized. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> after addition of HRP-Strept.	0.165 - 40.0	160	4.9 (intra-assay); 7.3 (inter-assay)	plasma	2h 30 min
Abnova KA 0475 human ELISA kit	Direct competitive immunoassay between Fib and Biotin-Fib with anti-Fib immobilized. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> after addition of HRP-Strept.	0.165 - 40.0	160	4.9 (intra-assay); 7.3 (inter-assay)	plasma	2h 30 min
Alpco 41-FIBHU-E01 human ELISA kit	Sandwich immunoassay with anti-Fib immobilized and HRP-anti-Fib. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	up to 0.4	-	-	plasma	1h 30 min
Molecular Innovations HF1BKT human ELISA kit	Sandwich immunoassay with anti-Fib immobilized, Biotin-anti-Fib, and HRP-Avidin. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(3.125 - 800) x 10 <sup>-3</sup>	1.4	-	plasma	1h 30 min
GenWay 40-288-22856 human ELISA kit	Sandwich immunoassay with anti-Fib immobilized and HRP-anti-Fib. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(6.25 - 400) x 10 <sup>-3</sup>	-	-	plasma	4h
Gentaur Assay Max human ELISA kit EF1040-1	Direct competitive immunoassay between Fib and Biotin-Fib with anti-Fib immobilized. Colorimetric detection using TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> after addition of HRP-Strept	0.16 - 120	100	6.8 (intra-assay); 8.8 (inter-assay)	plasma	2h 30 min
HRP-anti-Fib-Fib-CNHs/SPCE	Indirect competitive immunoassay with Fib immobilized onto CNHs/SPCE. Amperometric detection at -50 mV after immobilization of HRP-anti-Fib and addition of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in the presence of HQ	0.1 - 100	58	3.8 (intra-assay); 6.7 (inter-assay)	certified plasma, urine	1h 15 min