

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



TESIS DOCTORAL

**Nanomateriales híbridos para el diseño de biosensores
enzimáticos electroquímicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Abderrahmane Boujakhrou

Directores

Reynaldo Villalonga Santana
Paloma Martínez Ruiz
José Manuel Pingarrón Carrazón

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**NANOMATERIALES HÍBRIDOS PARA EL DISEÑO
DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS
ELECTROQUÍMICOS**

Directores:

Prof. Dr. Reynaldo Villalonga Santana

Prof. Dr. Paloma Martínez Ruiz

Prof. Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

ABDERRAHMANE BOUJAKHROUT

Madrid, 2017



Tel.: 91 394 43 31
Fax: 91 394 43 29
E- mail: depquian@quim.ucm.

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
28040 MADRID

D. Reynaldo Villalonga Santana, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

D^a Paloma Martínez Ruiz, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

D. José Manuel Pingarrón Carrazón, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

HACEN CONSTAR,

Que el trabajo titulado ***“NANOMATERIALES HÍBRIDOS PARA EL DISEÑO DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS ELECTROQUÍMICOS”*** ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor

Madrid, 26 de Abril de 2017

**Fdo. Reynaldo Villalonga
Santana**

**Paloma Martínez
Ruiz**

**José Manuel Pingarrón
Carrazón**

Fdo. Abderrahmane Boujakhrou

AGRADECIMIENTOS

No pensaba que este momento fuera a llegar tan pronto. Lo he deseado durante mucho tiempo y ahora que me encuentro delante de estas páginas en blanco, echo la vista atrás y me vienen miles de recuerdos a la mente.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de Tesis. Al Profesor Dr. Reynaldo Villalonga Santana, por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo. Gracias por su acertada orientación en mi investigación y por haberme enseñado a trabajar con rigor y seriedad. Gracias por alentarme siempre a la consecución de objetivos que a primera vista me parecían imposibles. A su lado han aflorado aspectos muy positivos de mí que desconocía en un principio. Gracias por confiar en mí y saber que llegaría hasta donde he llegado ahora. Escribiendo estas líneas siento el orgullo y la satisfacción de haber pertenecido a su grupo de investigación. También quiero tener un agradecimiento especial para la Profesora Dra. Paloma Martínez Ruiz, por abrirme las puertas al grupo de investigación, dándome la oportunidad de realizar el trabajo de fin de Máster el cual fue el primer paso en mi carrera de investigación. Muchas gracias también por toda su ayuda y el tiempo invertido en mi tesis. Quiero agradecer al Profesor Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón, por la confianza puesta en mí para el desarrollo de este trabajo de investigación y abrirme las puertas a sus laboratorios. Muchas gracias por haberme dado la posibilidad de comenzar una carrera investigadora, y de conseguir retos que nunca habría imaginado. Gracias a los tres por su amistad y por haber posibilitado la experiencia profesional más significativa de mi vida.

Me gustaría agradecer en estas líneas a todas las personas que han contribuido directamente a la realización de este trabajo. Gracias Paula, Alfredo, Sandra, Paul, Bory y Eloy.

También quiero agradecer a todos los compañeros del Departamento de Química Analítica, y en especial a los miembros del Grupo de investigación donde he desarrollado este trabajo. Gracias Araceli, Paloma Yáñez, Lourdes, Concha, Susana, María, Julio, Irene, Víctor, Verónica, Gonzalo, Belkis, Cristian, Iñigo, Oscar y Elena.

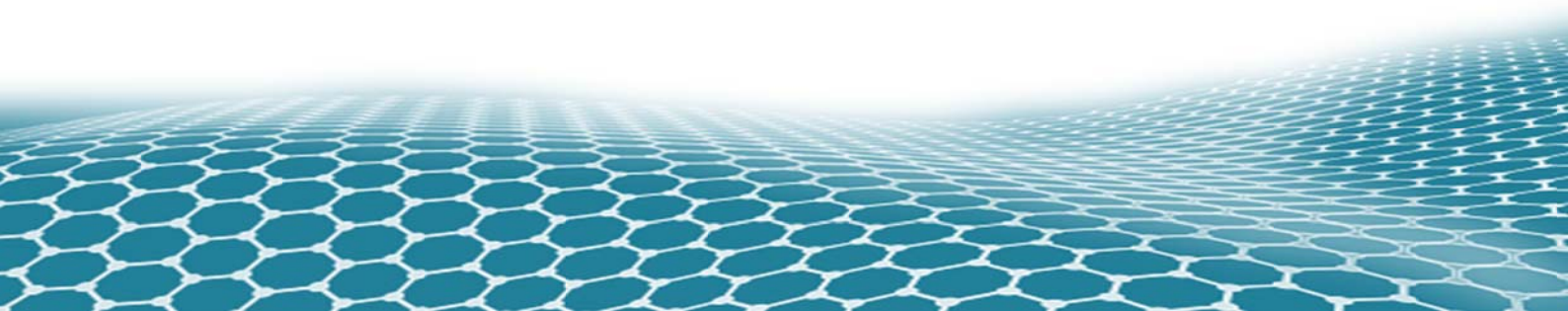
Agradezco al Profesor Dr. Belkheir Hammouti por su apoyo y confianza, y por brindarme la posibilidad de colaborar en sus investigaciones.

Quiero agradecer especialmente a mi familia, a mis padres, a mis hermanos y a mi esposa, por todo el amor y confianza depositada en mí.

Finalmente, quiero dedicar este trabajo a mis hijos. A Ayman y la bebé que pronto llegará.

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE



	Página
1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
3. SUMMARY	17
4. RESUMEN	23
5. ANTECEDENTES	29
5.1. Biosensores electroquímicos	31
5.1.1. Sensores	31
5.1.2. Biosensores. Concepto	31
5.1.2.1. Clasificación de los biosensores	33
5.1.2.2. Biosensores electroquímicos	34
5.1.2.3. Biosensores enzimáticos amperométricos	36
5.1.2.4. Electrodo funcionalizado con nanomateriales	39
5.2. Nanomateriales híbridos para la fabricación de plataformas biosensoras	43
5.2.1. Nanomateriales híbridos	43
5.2.2. Nanomateriales híbridos de grafeno	47
5.2.2.1. Nanomateriales híbridos de grafeno y nanopartículas metálicas	51
5.2.2.2. Nanomateriales híbridos de grafeno y polímeros	54
5.2.2.2.1. Polímeros de quitosano	55
5.2.2.2.2. Polímeros de dextrano	57
5.2.3. Nanopartículas anisotrópicas tipo Janus	59
5.2.4. Nanomateriales basados en polímeros de coordinación	62
5.3. Biosensores enzimáticos para compuestos de interés analítico	65
5.3.1. Biosensores para catecol	65
5.3.1.1. Biosensores basados en la enzima lacasa	66
5.3.1.2. Biosensores basados en la enzima tirosinasa	68
5.3.2. Biosensores para D-glucosa	70
5.3.3. Biosensores para peróxido de hidrógeno	73
6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	77
7. PARTE EXPERIMENTAL	83
7.1. Instrumentación	85
7.1.1. Aparatos y técnicas de caracterización	85
7.1.2. Electrodo y celda de trabajo	88
7.2. Reactivos y materiales	89
7.3. Disoluciones	93

7.4. Metodología	94
7.4.1. Limpieza y preparación del electrodo de carbono vitrificado (GCE)	94
7.4.2. Preparación de un biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano	94
7.4.2.1. Preparación del nanomaterial híbrido de grafeno y glicolquitosano	94
7.4.2.2. Ensamblaje del electrodo enzimático con lacasa	95
7.4.2.3. Preparación y análisis de muestras de infusiones	95
7.4.3. Preparación de un biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano	96
7.4.3.1. Síntesis de dextrano funcionalizado con un grupo tiol terminal	96
7.4.3.2. Preparación de la disolución de nanopartículas de Au coloidal	97
7.4.3.3. Preparación del nanomaterial híbrido de grafeno, oro y dextrano	97
7.4.3.4. Ensamblaje del electrodo enzimático con tirosinas	98
7.4.4. Preparación de un biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple	99
7.4.4.1. Preparación de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa	99
7.4.4.2. Inmovilización sitio-selectiva de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa en las nanopartículas Janus	100
7.4.4.3. Preparación del electrodo bienzimático	102
7.4.4.4. Preparación y análisis de muestras de bebidas comerciales	102
7.4.5. Preparación de plataformas de detección electroquímica basadas en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro	103
7.4.5.1. Preparación del nanomaterial híbrido (Au-NBx)	103
7.4.5.2. Estudio de actividad catalítica tipo peroxidasa de los nanohíbridos	104
7.4.5.3. Ensamblaje de un electrodo enzimático de peroxidasa para H ₂ O ₂	104
7.4.5.4. Preparación de un sensor nanoestructurado con Au-NB200 para H ₂ O ₂	105
7.4.5.5. Preparación de un biosensor enzimático nanoestructurado con Au-NB200 para D-glucosa	105

7.5. Técnicas electroquímicas de análisis y caracterización	105
7.5.1. Espectroscopia de impedancia electroquímica	105
7.5.2. Voltamperometría cíclica	106
7.5.3. Amperometría en disoluciones agitadas	106
8. RESULTADOS Y DISCUSION	107
8.1. Biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano	109
8.1.1. Preparación del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano	111
8.1.2. Caracterización del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.	113
8.1.2.1. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia FT-IR	113
8.1.2.2. Caracterización del nanohíbrido por termogravimetría	115
8.1.2.3. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia Raman.	116
8.1.2.4. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo	118
8.1.2.5. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de transmisión	119
8.1.3. Ensamblaje del electrodo enzimático de lacasa	119
8.1.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje	120
8.1.3.2. Caracterización del electrodo enzimático	124
8.1.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida	128
8.1.4. Características analíticas del biosensor	129
8.1.4.1. Especificidad del biosensor	129
8.1.4.2. Curva de calibración y rango lineal	130
8.1.4.3. Sensibilidad del biosensor	132
8.1.4.4. Límite de detección del biosensor	133
8.1.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático	134
8.1.4.6. Repetitividad de las medidas	134
8.1.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor	135
8.1.4.8. Interferencias	135
8.1.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor	136
8.1.5. Evaluación del biosensor en la determinación del contenido de fenoles totales en muestras de infusiones	137
8.1.6. Evaluación del biosensor en la determinación simultánea de catecol	139

y 4-aminofenol	
8.2. Biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano	143
8.2.1. Preparación del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con dextrano	145
8.2.2. Caracterización del nanomaterial híbrido	148
8.2.2.1. Caracterización del nanohíbrido mediante FT-IR	148
8.2.2.2. Caracterización del nanohíbrido por termogravimetría	150
8.2.2.3. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia Raman	151
8.2.2.4. Caracterización del nanohíbrido mediante difracción de rayos X	153
8.2.2.5. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo	154
8.2.2.6. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de transmisión	155
8.2.2.7. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía de fuerza atómica	156
8.2.3. Ensamblaje del electrodo enzimático de tirosinasa	158
8.2.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje	159
8.2.3.2. Caracterización del electrodo enzimático	162
8.2.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida	164
8.2.4. Características analíticas del biosensor	166
8.2.4.1. Especificidad del biosensor	166
8.2.4.2. Curva de calibración y rango lineal	167
8.2.4.3. Sensibilidad del biosensor	169
8.2.4.4. Límite de detección del biosensor	169
8.2.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático	170
8.2.4.6. Repetitividad de las medidas	171
8.2.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor	171
8.2.4.8. Interferencias	172
8.2.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor	172
8.3. Biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple	177

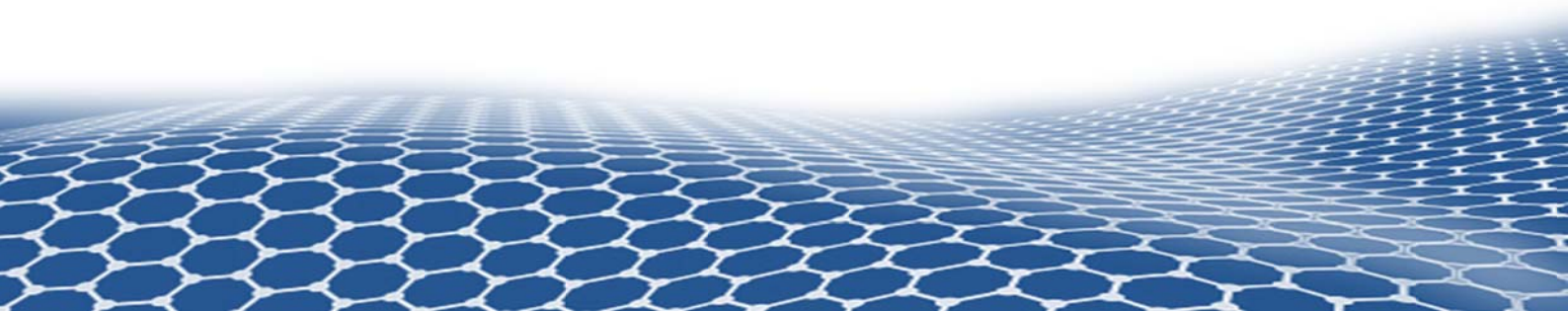
8.3.1. Preparación de las nanopartículas Janus	177
8.3.2. Caracterización de las nanopartículas Janus	179
8.3.2.1. Caracterización mediante espectroscopia FT-IR	179
8.3.2.2. Caracterización las nanopartículas Janus mediante espectroscopia UV-visible	180
8.3.2.3. Caracterización las nanopartículas Janus mediante termogravimetría	181
8.3.2.4. Caracterización mediante difracción de rayos X	182
8.3.2.5. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión	183
8.3.2.6. Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno	183
8.3.3. Ensamblaje del electrodo bienzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa	185
8.3.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje del electrodo	188
8.3.3.2. Caracterización del electrodo enzimático	192
8.3.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida	194
8.3.4. Características analíticas del biosensor	196
8.3.4.1. Especificidad del biosensor	196
8.3.4.2. Curva de calibración y rango lineal	197
8.3.4.3. Sensibilidad del biosensor	199
8.3.4.4. Límite de detección del biosensor	200
8.3.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático	200
8.3.4.6. Repetitividad de las medidas	201
8.3.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor	201
8.3.4.8. Interferencias	201
8.3.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor	202
8.3.5. Evaluación del biosensor en la determinación del contenido de D-glucosa en muestras de refrescos	204
8.4. Plataformas de detección electroquímica basadas en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro	205
8.4.1. Preparación del nanomaterial híbrido de nanocintas de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro	207
8.4.2. Caracterización de los nanohíbridos de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro	212
8.4.2.1. Caracterización de los nanohíbridos mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X	212

ÍNDICE

8.4.2.2. Caracterización de los nanohíbridos mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo	213
8.4.2.3. Caracterización del nanohíbrido Au-NB200 mediante microscopía electrónica de transmisión	215
8.4.2.4. Caracterización del nanohíbrido Au-NB200 mediante XPS	216
8.4.2.5. Determinación de la actividad tipo peroxidasa de los nanohíbridos	219
8.4.2.6. Determinación de la actividad electrocatalítica de los nanohíbridos	222
8.4.3. Ensamblaje de un electrodo enzimático de peroxidasa de tercera generación	223
8.4.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje	224
8.4.3.2. Caracterización del electrodo enzimático	226
8.4.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida	228
8.4.4. Características analíticas del biosensor	230
8.4.4.1. Curva de calibración y rango lineal	230
8.4.4.2. Sensibilidad del biosensor	232
8.4.4.3. Límite de detección del biosensor	233
8.4.4.4. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático	234
8.4.4.5. Repetitividad de las medidas	234
8.4.4.6. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor	234
8.4.4.7. Interferencias	235
8.4.4.8. Tiempo de vida útil del biosensor	235
8.4.5. Preparación y caracterización de otros (bio)sensores electroquímicos nanoestructurados con Au-NB200	236
9. CONCLUSIONES	239
10. REFERENCIAS	243
11. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	273

1

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS



1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

Ada: Adamantano

AFM: Microscopía de fuerza atómica

AgNPs: Nanopartículas de plata

APTES: (3-Aminopropil)trimetoxisilano

Au-CZF: Nanopartículas de oro modificadas con fibras de zeína

Au-NB200: Nanohíbrido de coordinación preparado con 200 μL de disolución de nanopartículas de oro

AuNC: Nanocubos de oro

AuNPs: Nanopartículas de oro

BSA: Albúmina de suero bovino

Cas: Caseína

Cat: Enzima catalasa

CD: β -Ciclodextrina

C-Dots: Puntos cuánticos de carbono

CH₃CN: Acetonitrilo

CMC: Carboximetilcelulosa

CNFs: Nanofibras de carbono

CNi: Nanopartículas de Níquel

CNTs: Nanotubos de carbono

CoPs: Ftalocianina de cobalto

CP: Polímeros de coordinación

CPE: Electrodo de pasta de carbón

CS: Quitosano

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

Cu₂O: Nanocubos de Cu₂O

CV: Voltamperometría cíclica

Cys: Cisteamina

D₂O: Agua deuterada

Dex: Dextrano

DHP: Dihexadecilfosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTSSP: 3,3'-Ditiobis(sulfosuccinimidil propionato)

EDAC: N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EIS: Espectroscopía de impedancia electroquímica

Fe₃O₄: Nanopartículas de Fe₃O₄

FE-SEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

fGr: Grafeno funcionalizado

FT-IR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

GCE: Electrodo de carbono vitrificado

GCS: Glicolquitosano

GF: Grafeno

GLU: Glutaraldehído

GO: Óxido de grafeno

GO_x: Glucosa oxidasa

GS@CeO₂: Láminas de grafeno y óxido de cerio

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HAuCl₄: Ácido tetracloroáurico

Hb: Hemoglobina

HRP: Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*)

HR-TEM: Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución

IL: Líquido iónico

IrOx: Óxido de iridio

ITO: Óxido de indio y estaño

JNP: Nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa

Lac: Lacasa

LD: Límite de detección

MCNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

MHz: Mega Hertzios

MOFs: Estructuras metalorgánicas

MSN: Nanopartículas mesoporosas

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

MTPS: (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano

NaBH₃CN: Cianoborohidruro sódico

NaBH₄: Borohidruro sódico

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NF: nafión

NHS: *N*-Hidroxisuccinimida

N-OMC: Carbón mesoporoso dopado con nitrógeno

NPs: Nanopartículas

OMC: Carbón mesoporoso ordenado

PAMAM: Dendrímero de poli(amido amina)

PANI: Polianilina

PdCuNC: Nanocajas de Pd-Cu

PdNPs: Nanopartículas de paladio

PEP: Péptido

PGE: Electrodo de grafito

Poly(BSeTT): Poli(4,7-bis (tieno [3,2-b] tiofen-2-il)benzo[c][1,2,5]selenodiazol)

PPATT: Poli(4'-Pirazina-2,2':5',2''-tertiofeno)

PPD: Poli(parafenilendiamina)

PPO: Polifenol oxidasa

PtNPs: Nanopartículas de platino

PVA: Alcohol polivinílico

PyOx: Piranosa oxidasa

QDs: Puntos cuánticos

rGO: Óxido de grafeno reducido

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

SCE: Electrodo saturado de calomelanos

SD: Desviación estándar

SiO₂: Nanopartículas de sílice

SiO₂-ZrO₂: Nanopartículas de sílice modificadas con óxido de zirconio

SPE: Electrodo serigrafiado de carbono

SWNTs: Nanotubos de carbono de pared simple

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

TEOS: Tetraetilortosilicato

TG: Termogravimetría

Thi: Tionina

TNT: Nanotubos de TiO₂

Tir: Tirosinasa

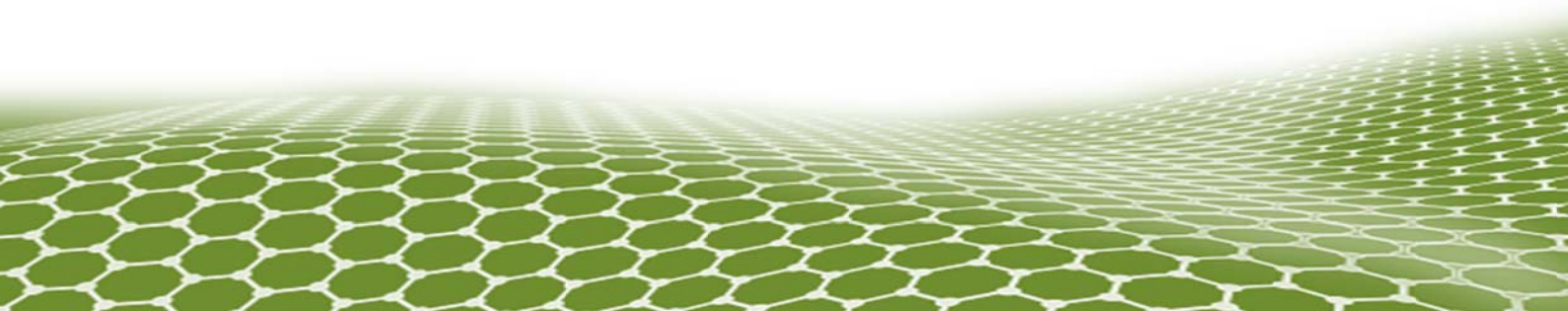
UV/Vis: Espectrometría Ultravioleta-visible

XPS: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

ZnO: Nanopartículas de óxido de zinc

2

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



2. FIGURAS Y TABLAS

5. ANTECEDENTES

Figuras

Figura 5.1.	Esquema general de un biosensor.	32
Figura 5.2.	Representación esquemática de un biosensor electroquímico.	35
Figura 5.3.	Nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de los biosensores.	40
Figura 5.4.	Número de publicaciones científicas sobre nanomateriales desde el año 2000 a la actualidad.	41
Figura 5.5.	Representación esquemática de las diferencias estructurales entre un nanohíbrido de grafeno y polímero preparado mediante unión química (A) o interacción intersticial (B), y un material nanocompuesto (C).	45
Figura 5.6.	Clasificación de los nanomateriales híbridos.	46
Figura 5.7.	Nanomateriales de carbono más empleados en bioelectroanálisis.	47
Figura 5.8.	Preparación de óxido de grafeno por el método de Hummers.	49
Figura 5.9.	Estructura de los polisacáridos quitina, quitosano y glicolquitosano.	56
Figura 5.10.	Estructura del polisacárido dextrano.	58
Figura 5.11.	Nanomateriales anisotrópicos tipo Janus.	59
Figura 5.12.	Representación de las tres vías principales de obtención de nanopartículas Janus: enmascaramiento, separación de fase y autoensamblaje.	61
Figura 5.13.	Nanomáquina estímulo-dependiente basada en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa.	62
Figura 5.14.	Diferentes morfologías de nanomateriales basados en polímeros de coordinación.	63
Figura 5.15.	Estructura tridimensional de la lacasa de hongos.	66
Figura 5.16.	Reacción de oxidación de fenoles catalizada por lacasas.	68
Figura 5.17.	Estructura tridimensional de la tirosinasa de hongos.	69
Figura 5.18.	Oxidación de catecol en presencia de tirosinasa.	69
Figura 5.19.	Estructura tridimensional de la glucosa oxidasa de <i>A. niger</i> .	71
Figura 5.20.	Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano.	73

Tablas

Tabla 5.1.	Biosensores enzimáticos preparados con nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas.	53
Tabla 5.2.	Parámetros analíticos de biosensores de lacasa para catecol.	67

2. FIGURAS Y TABLAS

Tabla 5.3.	Parámetros analíticos de biosensores de tirosinasa para catecol.	70
Tabla 5.4.	Parámetros analíticos de biosensores enzimáticos para D-glucosa.	72
Tabla 5.5.	Parámetros analíticos de biosensores de peroxidasa para H ₂ O ₂ .	74

6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Figuras

Figura 6.1.	Representación esquemática de las plataformas electroanalíticas desarrolladas: (A) biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano, (B) biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano, (C) biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple, (D) biosensor enzimático y (E) sensor electroquímico para peróxido de hidrógeno basados en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro.	81
--------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

7. PARTE EXPERIMENTAL

Figuras

Figura 7.1.	Potenciostato de Inbea Biosensores S.L. y agitador magnético Microstirrer.	86
Figura 7.2.	Potenciostato μ Autolab tipo III empleado para realizar las medidas de CV y EIS.	87
Figura 7.3.	Sistema convencional de 3 electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) empleado en las medidas electroquímicas.	88

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Figuras

Figura 8.1.	Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.	111
Figura 8.2.	Representación esquemática de las reacciones de formación de los enlaces amino secundarios en el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.	112
Figura 8.3.	Espectros FT-IR del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).	113

2. FIGURAS Y TABLAS

Figura 8.4.	Análisis termogravimétrico del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).	115
Figura 8.5.	Espectros Raman del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).	117
Figura 8.6.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo del óxido de grafeno (A) y el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (B).	118
Figura 8.7.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del óxido de grafeno (A) y el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (B).	119
Figura 8.8.	Representación esquemática del proceso de ensamblado del electrodo enzimático.	120
Figura 8.9.	Influencia de la cantidad de nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.	121
Figura 8.10.	Influencia de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.	122
Figura 8.11.	Influencia de la cantidad de enzima sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.	123
Figura 8.12.	Imagen de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de la superficie del electrodo de lacasa inmovilizada sobre el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano.	124
Figura 8.13.	Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (b) y la enzima (c). Diagrama de Nyquist obtenido con un electrodo de carbono vitrificado modificado con óxido de grafeno (d). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1).	125
Figura 8.14.	Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 5.5, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de lacasa inmovilizada sobre carbono vitrificado recubierto con nanohíbrido de óxido de grafeno	127

2. FIGURAS Y TABLAS

	reducido-glicolquitosano (a) y óxido de grafeno reducido (b) en ausencia (líneas de puntos) y presencia (líneas continuas) de catecol 60 μM .	
Figura 8.15.	Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5.	128
Figura 8.16.	Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{\text{apl}} = -0.15 \text{ V vs Ag/AgCl}$.	129
Figura 8.17.	Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 5.5. $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V vs Ag/Ag/Cl}$.	131
Figura 8.18.	Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de catecol empleando el biosensor enzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 5.5. $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V vs Ag/Ag/Cl}$.	131
Figura 8.19.	Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C, en solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5 (A) o en condiciones de sequedad (B), sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.	136
Figure 8.20.	Relación entre las señales analíticas obtenidas con el biosensor y la absorbancia a 750 nm de las muestras de catecol analizadas por el método de Folin-Ciocalteu. A) Infusión de frutos rojos, B) Té verde al limón, y C) Infusión de menta-poleo.	138
Figura 8.21.	Voltamperogramas diferenciales de pulso adquiridos con el biosensor enzimático en solución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5, bajo las siguientes condiciones: A) en presencia de 4-aminofenol 20 μM y diferentes concentraciones de catecol (a-o: 0, 1, 5, 10, 14, 18, 22, 25, 29, 33, 37, 40, 50, 58 y 69 μM), y B) en presencia de catecol 40 μM y diferentes concentraciones de 4-aminofenol (a-l: 0, 0.5, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18 y 20 μM).	140
Figura 8.22.	Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.	146
Figura 8.23.	Representación esquemática de las reacciones involucradas en la síntesis del derivado monotiolado de dextrano.	147
Figura 8.24.	Espectros de ^1H -RMN del dextrano (A) y su derivado monotiolado (B).	147
Figura 8.25.	Espectros FT-IR del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b),	149

2. FIGURAS Y TABLAS

	nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).	
Figura 8.26.	Análisis termogravimétrico del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).	150
Figura 8.27.	Espectros Raman del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).	152
Figura 8.28.	Análisis mediante difracción de rayos X del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).	153
Figura 8.29.	Imagen de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.	155
Figura 8.30.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de baja (A) y alta resolución (B) del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.	156
Figura 8.31.	Imágenes de microscopía de fuerza atómica, medidas en modo de contacto intermitente (tapping), del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro antes (A) y después de su funcionalizadas con brochas de dextrano (B). C: Perfil de alturas de la sección transversal del nanohíbrido antes (a) y después de su funcionalizadas con brochas de dextrano (b).	157
Figura 8.32.	Representación esquemática del proceso de ensamblado del electrodo de tirosinasa.	158
Figura 8.33.	Influencia de la cantidad de nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.	159
Figura 8.34.	Influencia de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.	160
Figura 8.35.	Influencia de la cantidad de tirosinasa sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.	161
Figura 8.36.	Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el	162

2. FIGURAS Y TABLAS

nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano (b) y la enzima (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1). Gráfico insertado: Circuito equivalente de Randles.

Figura 8.37.	Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de tirosinasa inmovilizada sobre carbono vitrificado recubierto con el nanohíbrido de óxido de grafeno en ausencia (a) y presencia (b) de catecol 10 nM.	163
Figura 8.38.	Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0.	165
Figura 8.39.	Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{apl} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.	166
Figura 8.40.	Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/Ag/Cl.	167
Figura 8.41.	Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de catecol empleando el biosensor enzimático de tirosinasa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/Ag/Cl.	168
Figura 8.42.	Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.	173
Figura 8.43.	Representación esquemática del proceso de preparación de las nanopartículas Janus de Au y sílice mesoporosa.	177
Figura 8.44.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de sílice mesoporosa (A) y Au (B).	178
Figura 8.45.	Espectro FT-IR de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).	180
Figura 8.46.	Espectro UV-Visible de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.	180
Figura 8.47.	Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).	181
Figura 8.48.	Análisis mediante difracción de rayos X, a ángulos bajos (A) y altos (B), de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.	182
Figura 8.49.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las	183

2. FIGURAS Y TABLAS

	nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.	
Figura 8.50.	Isotermas de adsorción (círculos cerrados) y desorción (círculos abiertos) de N ₂ de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).	184
Figura 8.51.	Distribución del tamaño de poro para las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).	185
Figura 8.52.	Representación esquemática del proceso de biofuncionalización toposelectiva de las nanopartículas Janus con las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa.	186
Figura 8.53.	Representación esquemática del proceso de ensamblaje del biosensor bienzimático para la detección de D-glucosa.	187
Figura 8.54.	Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 6.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de carbono vitrificado modificados con GOx-HRP-JNP (A), nanotubos de carbono de pared simple (B) y GOx-HRP-JNP/CNT/GCE (C), en ausencia (a) y presencia de H ₂ O ₂ 3 mM (b) y D-glucosa (c).	188
Figura 8.55.	Influencia del contenido de nanotubos de carbono de pared simple oxidados sobre la respuesta amperométrica normalizada de los electrodos, empleando como analito D-glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0. E _{ap} = -0.10 V vs Ag/AgCl.	190
Figura 8.56.	Influencia del contenido de nanopartículas Janus bifuncionalizadas sobre la respuesta amperométrica normalizada de los electrodos, empleando como analito D-glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0. E _{ap} = -0.10 V vs Ag/AgCl.	191
Figura 8.57.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de los electrodos recubiertos con nanotubos de carbono de pared simple oxidados antes (A) y después de la deposición de las nanopartículas Janus bifuncionalizadas (B).	192
Figura 8.58.	Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con los nanotubos de carbono de pared simple (b) y las nanopartículas Janus bifuncionalizadas con enzimas (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 5 mM (1:1).	193
Figura 8.59.	Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando D-glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0.	195
Figura 8.60.	Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando glucosa 3 μM en disolución	196

2. FIGURAS Y TABLAS

	reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{apl} = -0.10 \text{ V vs Ag/AgCl}$.	
Figura 8.61.	Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor bienzimático para adiciones sucesivas de D-glucosa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -0.10 \text{ V vs Ag/Ag/Cl}$.	197
Figura 8.62.	Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de D-glucosa empleando el biosensor bienzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -0.10 \text{ V vs Ag/Ag/Cl}$.	198
Figura 8.63.	Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.	203
Figura 8.64.	Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de coordinación de plata-bipiridina decorado con nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	207
Figura 8.65.	Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	208
Figura 8.66.	Distribución de tamaño de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	209
Figura 8.67.	Espectro FT-IR de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	210
Figura 8.68.	Espectros XPS de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	211
Figura 8.69.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de los nanohíbridos Au-NB0 (a), Au-NB50 (b), Au-NB100 (c), Au-NB150 (d), Au-NB200 (e) y Au-NB300 (f).	214
Figura 8.70.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nanohíbridos Au-NB0 (A), y Au-NB200 (B-D).	215
Figura 8.71.	Distribución de tamaño del nanohíbrido Au-NB200.	216
Figura 8.72.	Espectros XPS del nanohíbrido Au-NB0.	217
Figura 8.73.	Espectros XPS del nanohíbrido Au-NB200.	218
Figura 8.74.	Representación esquemática de la reacción de oxidación de ABTS con H_2O_2 , catalizada por los nanohíbridos de coordinación de plata-bipiridina decorados con nanopartículas de oro bifuncionalizadas.	219
Figura 8.75.	Efecto del tiempo de incubación sobre la absorbancia a 405 nm de disoluciones de ABTS 9 mM y H_2O_2 3 mM, en fosfato de sodio 40 mM, pH 7.0, en presencia de diferentes nanohíbridos de coordinación a concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$.	220
Figura 8.76.	Efecto del contenido de nanopartículas de oro bifuncionalizadas sobre el incremento máximo de la absorbancia a 405 nm (A) y la velocidad inicial de reacción (B).	220
Figura 8.77.	Efecto de la concentración de ABTS (A) y H_2O_2 (B) sobre la velocidad inicial de las reacciones catalizadas por el nanohíbrido Au-NB200.	221

2. FIGURAS Y TABLAS

	Concentración de H ₂ O ₂ en (A) = 3 mM; concentración de ABTS en (B) = 9 mM.	
Figura 8.78.	Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0, empleando electrodos de carbono vitrificado modificados con Au-NB0 (A), Au-NB50 (B), Au-NB100 (C), Au-NB150 (D), Au-NB200 (E) y Au-NB300 (F), en ausencia (1) y presencia de H ₂ O ₂ 100 μM (2). Velocidad de barrido: 50 mV/s.	222
Figura 8.79.	Representación esquemática del proceso de construcción del electrodo enzimático.	224
Figura 8.80.	Influencia de la cantidad de nanohíbrido Au-NB200 sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H ₂ O ₂ 1.0 μM. E _{ap} = -100 mV vs Ag/AgCl.	225
Figura 8.81.	Influencia de la cantidad de enzima sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H ₂ O ₂ 1.0 μM. E _{ap} = -100 mV vs Ag/AgCl.	225
Figura 8.82.	Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el nanohíbrido Au-NB200 (b) y peroxidasa (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 5 mM (1:1).	227
Figura 8.83.	Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 6.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de HRP/Au-NB200/GCE (líneas azules), Au-NB200/GCE (líneas negras), Au-NB0/GCE (líneas verdes) y HRP/Au-NB0/GCE (líneas rojas) en ausencia (líneas de puntos) y presencia (líneas continuas) de H ₂ O ₂ 3.0 nM.	228
Figura 8.84.	Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H ₂ O ₂ 1.0 μM.	229
Figura 8.85.	Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH, tras la adición de 10 μL de H ₂ O ₂ 1.0 μM. E _{apl} = -0.10 V vs Ag/AgCl.	230
Figura 8.86.	Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de H ₂ O ₂ en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. E _{ap} = -100 mV vs Ag/Ag/Cl.	231
Figura 8.87.	Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de H ₂ O ₂ empleando el biosensor enzimático en disolución reguladora	231

2. FIGURAS Y TABLAS

de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

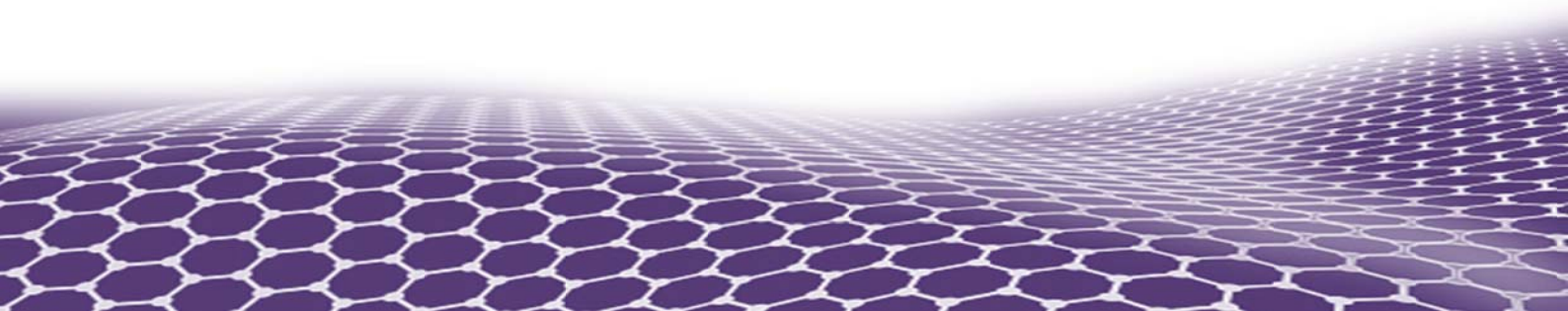
- Figura 8.88.** Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C, en solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5 (A) o en condiciones de sequedad (B), sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor. 236
- Figura 8.89.** Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de H₂O₂ empleando el electrodo nanoestructurado Au-NB200/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl. 237
- Figura 8.90.** Respuesta amperométrica del electrodo nanoestructurado con Au-NB200 frente a H₂O₂ (a), ácido ascórbico (b), ácido úrico (c), D-glucosa (d), L-tirosina (e) y D-sacarosa (f) 100 μM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl. 237
- Figura 8.91.** Curva de calibrado obtenida con el electrodo Au-NB200/GCE funcionalizado con glucosa oxidasa para la detección amperométrica de D-glucosa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl. 238

Tablas

- Tabla 8.1.** Características analíticas del biosensor frente a diferentes compuestos fenólicos. 130
- Tabla 8.2.** Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de lacasa para catecol. 133
- Tabla 8.3.** Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de tirosinasa para catecol. 170
- Tabla 8.4.** Comparación de los parámetros analíticos de biosensores nanoestructurados para D-glucosa. 199
- Tabla 8.5.** Determinación del contenido de D-glucosa en muestras de refrescos comerciales. 204
- Tabla 8.6.** Valores de composición de los nanohíbridos obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X. 213
- Tabla 8.7.** Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de peroxidasa para H₂O₂. 233

3

SUMMARY



3. SUMMARY

Nowadays, nanomaterials engineering is recognized as a top emerging technology that will have a major impact on the quality of science and society over the next years. This scientific field has already opened the possibility to tailor-made design advanced nanomaterials with desired physicochemical and functional properties, based on the rational manipulation of their chemical composition, morphology, size and surface derivatization.

These novel nanomaterials will allow the production of the next generation of biomaterials, computing systems, protective coatings, drug-delivery systems, electronic devices, functional textiles and wearable devices, and sensor systems with improved properties and nanometric dimensions.

In this context, the ultimate goal for nanomaterials engineering is the establishment of original synthetic strategies for the rational preparation of nanosized structures with unique and well-defined characteristics. Special attention is currently devoted to the design of novel functional nanomaterials for emerging biologically driven applications. These materials should be provided with specific chemical functionalities to ensure high biocompatibility, hydrophilicity and capacity for the stable immobilization of biologically-active macromolecules.

A rational strategy to prepare these novel nanostructures is the tailored functionalization with other molecular or nanosized materials to yield hybrid derivatives, in which the resulting structure, degree of organization and therefore the synergistic and novel properties are ruled by the chemical nature and molecular architecture of the individual components. In particular, considerable interest is currently devoted to the preparation of conductive hybrid nanomaterials with improved biocompatibility for proteins, nucleic acids, cells and tissues oriented to the fabrication of bioelectronics, biocomputing and biosensing systems.

This PhD Thesis describes original approaches for the preparation of advanced hybrid nanomaterials for sensitive electrochemical biosensing. The first part, published in *Analyst* **141**, 2016, 4162-4169, describes the preparation of a novel water-soluble graphene oxide

3. SUMMARY

derivative through a two-step modification approach. Graphene oxide was first provided with reactive epoxy groups by covalent modification with (3-glycidyloxypropyl)-trimethoxysilane and further cross-linked with glycol chitosan. This graphene derivative was characterized by different microscopy and physicochemical methods and employed as coating material for glassy carbon electrode.

The nanostructured surface was used as support for the covalent immobilization of the enzyme laccase through cross-linking with glutaraldehyde. The enzyme electrode was tested for the amperometric detection of different phenolic compounds, showing excellent analytical behaviour toward catechol with a linear range of response from 0,2 μM to 15 μM , sensitivity of 93 $\text{mA}/\text{M cm}^2$, and low detection limit of 76 nM. The enzyme biosensor showed high stability when stored at 4°C under dry conditions, and was successfully employed to quantify total phenolic compounds in commercial herbal tea samples.

In the second part, published in *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 2015, 3518-3524, a novel strategy to prepare a water-soluble graphene oxide derivative is reported, based on the use of dextran-based polymer brushes as solubilizing agents. Graphene oxide was first grafted with (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane and further decorated with Au nanoparticles. This hybrid nanomaterial was then reduced and anchored with polysaccharide-based polymer brushes by chemisorption of an end-group thiolated dextran derivative on the Au nanoparticles.

The resulting hybrid nonmaterial allowed highly stable aqueous dispersions to be obtained, which were used to coat glassy carbon electrodes for the preparation of a model tyrosinase electrochemical biosensor for catechol. The enzyme electrode showed excellent electroanalytical performance with fast response in about 5 s, linear range of (10^{-4} – 120) nM, a very high sensitivity of 45.9 A/M and very low detection limit of 40 pM for catechol.

In the third part, published in *ChemElectrochem* **2**, 2015, 1735-1741, gold-mesoporous silica Janus nanoparticles were prepared through a masking strategy and further employed as building blocks for the preparation of bienzyme biosensors by toposelective

3. SUMMARY

immobilization of the corresponding enzymes. The system was evaluated by immobilizing glucose oxidase and horseradish peroxidase on the Au and mesoporous silica faces, respectively.

The anisotropic nanoparticles were deposited on single-walled carbon nanotubes coated glassy carbon electrodes to construct an amperometric biosensor for glucose. The enzyme electrode showed excellent electroanalytical performance with fast response in about 6 s, linear range of (0,49-600) μM , a high sensitivity of 4.3 mA/M and low detection limit of 360 nM for glucose. This biosensor was successfully employed to determine the content of this monosaccharide in commercial soft drink samples.

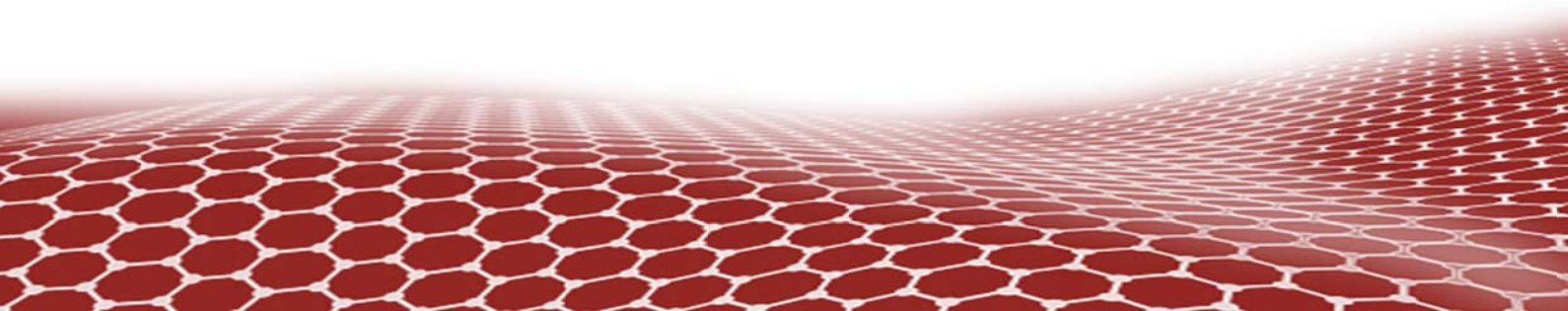
Finally, in the fourth part published in *RSC Advances* **6**, 2016, 74957-74960 and *Journal of Colloid and Interface Science* **482**, 2016, 105-111, we reported the synthesis of novel silver-bipyridine coordination polymers decorated with gold nanoparticles with intrinsic peroxidase-like activity. In this sense, Au nanoparticles modified with 4-mercaptopyridine and 6-mercapto-1-hexanol were used as coordination agents to prepare original hybrid nanomaterials with Ag:4,4'-bipyridine nanobelts. Both morphology and mimetic enzyme activity was tuned by rational manipulation of the nanohybrid composition.

The optimized nanohybrid Au-NB200 with high electrocatalytic activity toward H_2O_2 was employed to modify glassy carbon electrodes and to construct a horseradish peroxidase-based mediatorless amperometric biosensor for this analyte. The electrode, poised at -100 mV, exhibited a rapid response within 4 s and a linear calibration range from 90 pM to 6.5 nM H_2O_2 . The biosensor showed a high sensitivity of 283 A/M cm^2 and a very low detection limit of 45 pM at a signal-to-noise ratio of 3. The enzyme biosensor showed high stability when stored at 4°C under dry conditions, retaining over 96% and 78% of its initial activity after 15 and 30 days of storage, respectively.

This Au-NB200 hybrid nanomaterial was also used to construct two different (bio)sensing devices for the electrochemical determination of H_2O_2 and D-glucose.

4

RESUMEN



4. RESUMEN

En la actualidad, la ingeniería de nanomateriales está considerada como una de las tecnologías emergentes más importantes, la cual deberá impactar significativamente en la calidad de la ciencia y la sociedad en los próximos años. Esta rama científica ha abierto la posibilidad de diseñar nanomateriales avanzados a medida, los cuales presentan propiedades físico-químicas y funcionales concretas, logradas mediante la manipulación racional de sus composiciones químicas, morfología, tamaño y derivatización superficial.

Estos novedosos nanomateriales permitirán la producción de una nueva generación de biomateriales, sistemas de computación, pinturas y otros recubrimientos protectores, sistemas de liberación controlada de fármacos, ropas y accesorios inteligentes, dispositivos electrónicos y sistemas sensores de dimensiones nanométricas y propiedades mejoradas.

En este contexto, el objetivo principal de la ingeniería de nanomateriales es el establecimiento de estrategias originales para la preparación racional de nanoestructuras con propiedades fisicoquímicas y funciones únicas y bien definidas. En este sentido, el desarrollo de nuevos nanomateriales funcionales para su utilización en aplicaciones biológicas emergentes es un tema de investigación de plena actualidad que recibe un interés muy especial dentro de la comunidad científica internacional.

Una de las estrategias más efectivas para la preparación de nanoestructuras a medida es la funcionalización con otros materiales moleculares o nanométricos. Estos materiales deben proporcionar grupos funcionales específicos para garantizar una alta biocompatibilidad, hidrofiliidad y capacidad para la inmovilización estable de macromoléculas bioactivas. A partir de esta metodología se obtienen nanomateriales híbridos en los cuales la estructura, el nivel de organización y las propiedades nuevas y sinérgicas están moduladas por la naturaleza química y la arquitectura molecular de los componentes individuales.

En particular, la preparación de nanomateriales híbridos electroconductores con buenas propiedades de biocompatibilidad con proteínas, ácidos nucleicos, células y tejidos es de vital importancia para la fabricación de sistemas bioelectrónicos, bioinformáticos y biosensores.

4. RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se describen distintas metodologías originales para la preparación de nanomateriales híbridos avanzados para el desarrollo de biosensores electroquímicos altamente sensibles.

La primera parte de esta tesis (trabajo publicado en *Analyst* **141**, 2016, 4162-4169) describe la preparación de un novedoso derivado de grafeno soluble en agua mediante una modificación realizada en dos pasos. El óxido de grafeno fue inicialmente enriquecido con grupos epóxido reactivos mediante modificación covalente con (3-glicidiloxipropil)-trimetoxisilano, y posteriormente derivatizado con glicolquitosano. Este derivado de grafeno fue caracterizado mediante diversos métodos fisicoquímicos y de microscopía, y usado como material de recubrimiento para electrodos de carbono vitrificado.

Esta superficie nanoestructurada fue utilizada como soporte para la inmovilización covalente de la enzima lacasa mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído. El electrodo enzimático fue evaluado para la detección amperométrica de distintos compuestos fenólicos, mostrando un excelente comportamiento analítico hacia el catecol con una respuesta lineal en un rango de concentraciones de 0,2 μM a 15 μM , sensibilidad de 93 mA/M cm^2 , y límite de detección de 76 nM. El biosensor enzimático mostró alta estabilidad cuando se almacenó a 4°C bajo condiciones secas, y fue utilizado con éxito para cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos en muestras de infusiones comerciales.

En la segunda parte (trabajo publicado en *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 2015, 3518-3524) se presenta una novedosa estrategia para preparar un derivado de óxido de grafeno soluble en agua, basado en el uso de “brochas poliméricas” de dextrano como agentes solubilizantes. Para ello, el óxido de grafeno fue modificado en un primer paso con (3-mercaptopropil)-trimetoxisilano, y posteriormente decorado con nanopartículas de Au. Este nanomaterial híbrido se redujo y dio lugar a la generación de las brochas poliméricas mediante un proceso de quimisorción de un derivado de dextrano, tiolado en el residuo terminal de D-glucosa, sobre las nanopartículas de Au.

4. RESUMEN

El nanomaterial híbrido resultante permitió obtener una dispersión acuosa altamente estable, la cual fue utilizada para recubrir electrodos de carbono vitrificado para la preparación de un biosensor electroquímico de tirosinasa para la detección de catecol. El electrodo enzimático presentó excelentes propiedades electroanalíticas frente al catecol, con una rápida respuesta en alrededor de 5 s, rango lineal de (10^{-4} –120) nM, una extremadamente alta sensibilidad de 45.9 A/M y un límite de detección muy bajo de 40 pM.

En la tercera parte (trabajo publicado en *ChemElectrochem* **2**, 2015, 1735-1741) se prepararon nanopartículas Janus de oro y sílice mesoporosa mediante una estrategia de enmascaramiento. Estas nanopartículas fueron empleadas en el diseño de un biosensor bienzimático mediante la inmovilización toposelectiva de las enzimas de interés. El sistema fue evaluado inmovilizando glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano en la superficie de Au y la cara de sílice mesoporosa, respectivamente.

Las nanopartículas anisotrópicas fueron depositadas en electrodos de carbono vitrificado, previamente recubrimientos con nanotubos de carbono de pared simple, para construir un biosensor amperométrico para la D-glucosa. El electrodo enzimático mostró excelentes características electroanalíticas frente a D-glucosa, con un tiempo de respuesta de 6 s, rango lineal de (0,49-600) μ M, una alta sensibilidad de 4.3 mA/M y un límite de detección de 360 nM para este monosacárido. Este biosensor fue utilizado con éxito para determinar el contenido de D-glucosa en muestras de refrescos comerciales.

Finalmente, la cuarta parte de esta tesis describe el trabajo publicado en *RSC Advances* **6**, 2016, 74957-74960 y en *Journal of Colloid and Interface Science* **482**, 2016, 105-111. Aquí se presenta la síntesis de novedosos polímeros de coordinación de plata-bipiridina decorados con nanopartículas de oro, los cuales presentaron una actividad enzimática intrínseca tipo peroxidasa. En este sentido, se prepararon inicialmente nanopartículas de Au modificadas con 4-mercaptopiridina y 6-mercapto-1-hexanol, las cuales se usaron como agentes de coordinación para preparar nanomateriales híbridos basados en nanocintas de Ag:4,4'-bipiridina. Tanto la morfología como la actividad enzimática tipo peroxidasa de estos

4. RESUMEN

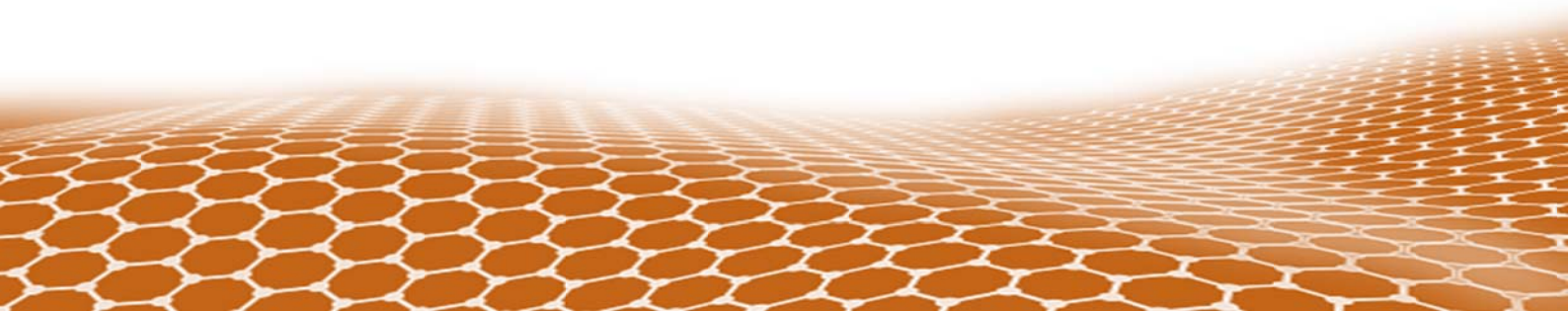
nanohíbridos pudieron ser racionalmente moduladas mediante la manipulación de la composición del nanohíbrido.

El nanohíbrido optimizado Au-NB200, con alta actividad electrocatalítica frente al H_2O_2 , fue empleado como elemento de transducción para construir un biosensor amperométrico de tercera generación para este analito. Para ello, este nanomaterial se empleó para modificar electrodos de carbono vitrificado, donde posteriormente se inmovilizó la enzima peroxidasa de rábano. El electrodo, operado a -100 mV, mostró una rápida respuesta frente al H_2O_2 de 4 s y un rango de calibración lineal para concentraciones de $(9 \cdot 10^{-4} - 6.5)$ nM. El biosensor mostró una alta sensibilidad de 283 A/M cm^2 y un límite de detección muy bajo de 45 pM para una relación señal/ruido de 3. El biosensor enzimático presento una alta estabilidad cuando se almacenó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo condiciones secas, manteniendo el 96% y 78% de su actividad inicial luego de 15 y 30 días de almacenamiento, respectivamente.

Este nanomaterial híbrido Au-NB200 también fue utilizado para construir dos dispositivos (bio)sensores diferentes para la determinación electroquímica de H_2O_2 y D-glucosa.

5

ANTECEDENTES



5. ANTECEDENTES

5.1. Biosensores electroquímicos

5.1.1. Sensores

Un sensor se define como un dispositivo capaz de recibir cierta información exterior y convertirla en una señal, generalmente de tipo eléctrica, que puede cuantificarse y analizarse [Hulanicki *et al.*, 1991]. Los sensores pueden clasificarse dentro de dos grupos principales, en función del tipo de información que reciben:

- **Sensores físicos:** son aquellos que convierten una magnitud física, como pueden ser temperaturas, presiones o movimientos en magnitudes eléctricas.
- **Sensores químicos:** son aquellos que son capaces de advertir cambios de tipo químico, como modificaciones de un analito o del pH, y realizar su caracterización por medio de señales eléctricas.

Los sensores químicos tienen una gran importancia en la investigación actual, debido a las necesidades crecientes de identificar un analito en muestras con un número elevado de componentes o bajo determinadas condiciones de muestreo. Otras ventajas de los sensores químicos son su pequeño tamaño, su capacidad de selectividad y su reducido coste, en comparación con otro tipo de instrumentación analítica.

5.1.2. Biosensores. Concepto

Un biosensor es un sensor químico en el que el sistema de reconocimiento se basa en un mecanismo de origen bioquímico. En concreto, puede ser definido de acuerdo con los protocolos estándar de la IUPAC como un dispositivo capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica empleando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) que es retenido en contacto espacial directo con un elemento de transducción [Luong *et al.*, 2008; Thévenot *et al.*, 2001].

5. ANTECEDENTES

En la **Figura 5.1** se representa el esquema general de un dispositivo biosensor.

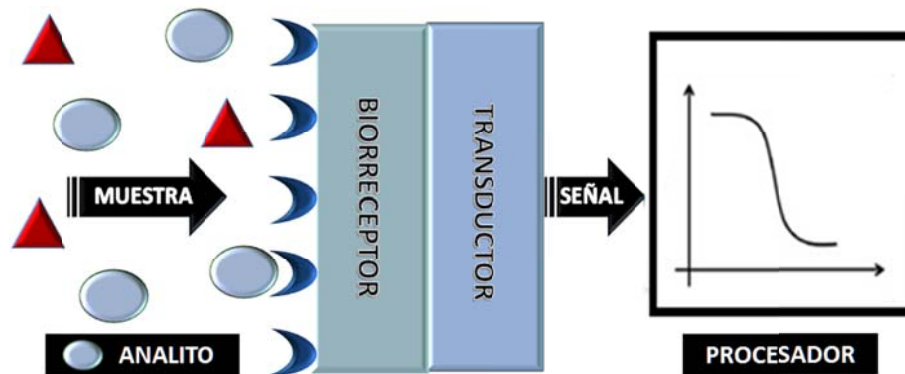


Figura 5.1. Esquema general de un biosensor.

El sistema de reconocimiento biológico se puede basar en una reacción química catalizada o en una reacción de equilibrio entre macromoléculas. En ambos casos debe existir una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo obviamente puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y preparación de sensores de dichas especies.

El transductor, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta analítica, que luego es amplificada o procesada y que estará relacionada con la concentración dicho analito. El transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la particularidad de la interacción del componente biológico con el analito.

Idealmente, el biosensor debe responder continua y reversiblemente a la especie de interés sin alterar la muestra, eliminando de este modo la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recogida [Pingarrón-Carrazón y Sánchez-Batanero, 1999].

5. ANTECEDENTES

5.1.2.1. Clasificación de los biosensores

La clasificación de los biosensores puede realizarse desde dos puntos de vista diferentes.

A) Clasificación basada en la naturaleza del proceso biológico.

Dentro de esta clasificación pueden distinguirse dos grandes grupos [Pingarrón-Carrazón y Sánchez-Batanero, 1999]:

1. **Biosensores catalíticos:** Basados en procesos de reconocimiento y transformación del analito. Estos biosensores pueden emplear enzimas, tejidos y células como elemento de reconocimiento.
2. **Biosensores de afinidad:** Se basan en la interacción de afinidad del analito con macromoléculas o estructuras moleculares complejas de forma específica, sin que se realice ninguna transformación química en la sustancia a determinar. En esta clasificación se incluyen los biosensores que emplean anticuerpos, lectinas, quimiorreceptores y ácidos nucleicos como elemento de reconocimiento.

B) Clasificación basada en el fundamento del transductor.

Según este criterio, los biosensores pueden clasificarse en:

1. **Electroquímicos:** Determinan cambios en las propiedades eléctricas del medio (corriente, potencial, conductividad, impedancia).
2. **Ópticos:** Detectan cambios en las propiedades ópticas de la muestra. Este tipo de biosensor permite la utilización de un gran número de técnicas ópticas basadas en procesos de absorción, fluorescencia, fosforescencia, resonancia de plasmón superficial, etc.
3. **Térmicos:** Determinan cambios térmicos asociados con el proceso de reconocimiento del analito por el biorreceptor.
4. **Piezoeléctricos:** Determinan variaciones en la magnitud de la masa, y transforman esta detección en una variable eléctrica: resistencia, capacitancia, tensión, corriente, frecuencia, entre otros.

5. ANTECEDENTES

Los biosensores juegan un papel muy importante en todas las áreas de interés analítico, destacando las relacionadas con la alimentación, la salud, industria agroalimentaria, medioambiental, químico, farmacéutico y militar [Turner, 1994; Mehrotra, 2016; Verma y Bhardwaj, 2015; Vigneshvar *et al.*, 2016; Murugaiyan *et al.*, 2014]. En la industria agroalimentaria, las mayores áreas de aplicación de los biosensores son la seguridad y calidad alimentaria, y el control de procesos [Arora *et al.*, 2011; Luong *et al.*, 1997].

Las características más destacables que convierten a los biosensores en opciones altamente atractivas para competir en el mercado con otras tecnologías analíticas son [Turner, 1994; Mehrotra, 2016; Verma y Bhardwaj, 2015]:

- Alta especificidad
- Elevada sensibilidad
- Bajos tiempos de análisis
- Posibilidad de ser incluidos en sistemas integrados
- Facilidad de automatización
- Capacidad de trabajar en tiempo real
- Alta versatilidad, que permite el diseño de dispositivos a la carta, y
- Bajo coste

5.1.2.2. Biosensores electroquímicos

Los transductores electroquímicos son los más utilizados en el diseño de biosensores debido a las importantes ventajas que presentan; entre otras, estos biosensores no sufren el inconveniente de la alta complejidad en la configuración del sensor y el coste de instalación [Wang, 2005]. Otras ventajas inherentes a los biosensores electroquímicos son su robustez, fácil miniaturización, excelentes límites de detección, también con volúmenes de analitos pequeños, y la capacidad para ser utilizado en biofluidos turbios con compuestos ópticamente absorbentes y fluorescentes [Ronkainen *et al.*, 2010; Grieshaber *et al.*, 2008]. En la **Figura 5.2** se muestra el esquema general de un biosensor electroquímico.

5. ANTECEDENTES

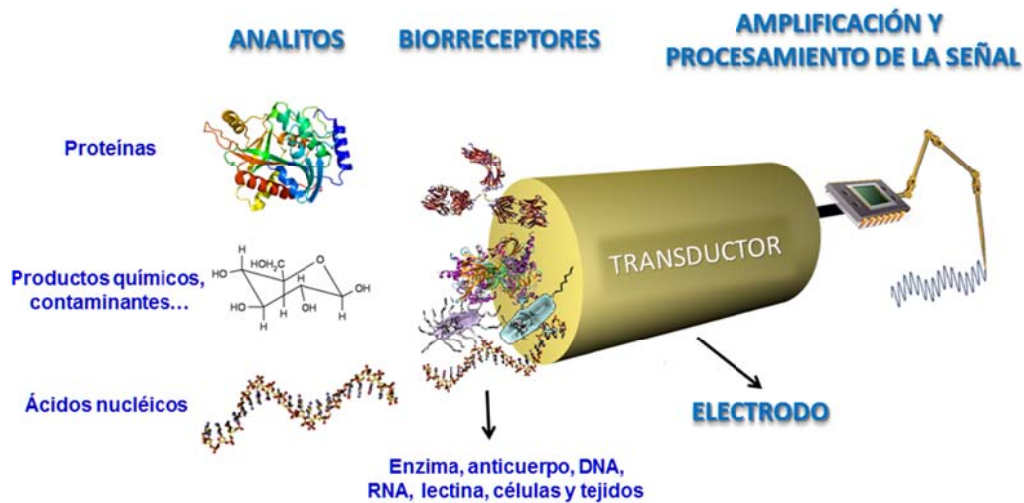


Figura 5.2. Representación esquemática de un biosensor electroquímico.

Los transductores electroquímicos se pueden clasificar según el tipo de medición empleado en:

1. **Potenciométricos:** Determinan cambios de potencial asociados al proceso de reconocimiento. Generalmente, en las mediciones potenciométricas se emplean electrodos selectivos a iones.
2. **Amperométricos:** Determinan cambios de corrientes eléctricas asociadas a procesos redox involucrados en el proceso de reconocimiento.
3. **Conductimétricos:** Detectan cambios en la conductancia de la muestra.
4. **Impedimétricos:** Basados en medidas de impedancia sobre la superficie del electrodo.

Entre ellas, las técnicas amperométricas son las más comúnmente empleadas en la construcción de biosensores electroquímicos. En amperometría, cambios en la corriente generada por la oxidación o la reducción electroquímica de los analitos diana se controlan directamente con el tiempo, mientras que se mantiene un potencial constante en el electrodo de trabajo con respecto a un electrodo de referencia. La corriente es proporcional a la concentración de la especie electroactiva en la muestra, lo que permite su fácil cuantificación [Pingarrón-Carrazón y Sánchez-Batanero, 1999].

5. ANTECEDENTES

La detección amperométrica se ha utilizado exhaustivamente con biosensores biocatalíticos y de afinidad debido a su simplicidad y bajo límite de detección [El Harrad y Amine, 2016; Salvador y Marco, 2016; Tang *et al.*, 2017; Vásquez *et al.*, 2017]. Ventajosamente, el potencial fijo durante la detección amperométrica resulta en una insignificante corriente de carga (la corriente necesaria para aplicar el potencial al sistema), lo que minimiza la señal de fondo que afecta negativamente al límite de detección. Adicionalmente, los biosensores amperométricos tienen una selectividad adicional ya que el potencial de oxidación o reducción utilizado es característico para la detección de los distintos analitos [Eggins, 2002].

5.1.2.3. Biosensores enzimáticos amperométricos

Aunque en el diseño de biosensores amperométricos se han empleado muchos tipos de elementos de biorreconocimiento, las enzimas son los receptores más antiguos y más utilizados debido a su alta actividad biocatalítica y especificidad [Cordeiro *et al.*, 2016; Weltin *et al.*, 2016; Romero-Arcos *et al.*, 2016]. Estos dispositivos suelen tener diseños relativamente simples y no requieren instrumentación costosa. Por lo tanto, son dispositivos de fácil manejo, compactos y de bajo costo [Arduini *et al.*, 2016].

Las enzimas son proteínas globulares que catalizan reacciones biológicas en las células [Krebs y Boyer, 1987]. En las reacciones enzimáticas la molécula transformada se denomina sustrato, y esta transformación puede implicar el uso de otro reactivo comúnmente llamado cofactor. El carácter catalítico de las reacciones enzimáticas hace que la enzima se regenere a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Esta característica hace que, en principio, sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre con otro tipo de material biológico, como es el caso de los anticuerpos [Bartlett y Whitaker, 1987].

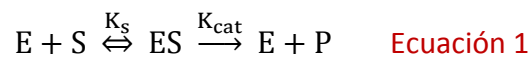
La reacción catalítica enzimática es muy eficiente y además extremadamente selectiva, por lo que se combinan los factores de reconocimiento particular y de amplificación

5. ANTECEDENTES

requeridos para la mayoría de las aplicaciones analíticas de los biosensores. En especial, la alta selectividad de las enzimas elimina la necesidad de realizar etapas de pretratamiento y separación de interferencias en muestras complejas, las cuales consumen tiempo e implican la necesidad de mano de obra especializada [Copeland, 2000].

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de enzima, y cuando el sustrato está en exceso existe una relación entre dicha velocidad y la concentración del biocatalizador. Para concentraciones bajas de sustrato, la velocidad (V_0) en los inicios de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato y por lo tanto se establece un sistema de primer orden. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración, la velocidad se vuelve de orden fraccionario y posteriormente de orden cero. En este último caso la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, ya que la enzima alcanza su saturación.

Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, el mecanismo cinético de la transformación puede ser formulado según la siguiente expresión [Copeland, 2000]:



A partir de este mecanismo, y para una concentración de enzima fija, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{(K_M + [S])} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde,

- $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción
- K_M es la constante de Michaelis- Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten puede reagruparse matemáticamente al aplicar una doble recíproca, para obtener una nueva expresión:

5. ANTECEDENTES

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{(V_{\text{máx}}[S])} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Con la ecuación anterior, conocida como ecuación de Lineweaver-Burk, se obtiene una línea recta cuando se representa $1/V_0$ en función de $1/[S]$, cuya pendiente y ordenada en el origen son $K_M/V_{\text{máx}}$ y $1/V_{\text{máx}}$, respectivamente [Copeland, 2000].

Desde un punto de vista analítico, cuánto más alta es la constante de Michaelis-Menten menor es la sensibilidad del método, pero mayor es el intervalo de linealidad. Por todo esto, un aspecto interesante a tener en cuenta cuando se trabaja con biosensores es el conocimiento de las variables cinéticas de la reacción enzimática que tiene lugar, con el fin de obtener la velocidad de dicha reacción, así como el intervalo lineal que se puede alcanzar, lo que constituye una importante característica analítica para la aplicación de los biosensores desarrollados [Amine *et al.*, 2016; Palchetti, 2016].

Antes de calcular las constantes cinéticas en un biosensor amperométrico es preciso verificar si la reacción enzimática obedece una cinética de tipo Michaelis–Menten aplicando el análisis de Hill a los datos obtenidos. La ecuación de Hill para un biosensor que obedece el comportamiento de Michaelis–Menten es:

$$\log \left\{ \left(\frac{i_{\text{máx}}}{i} \right) - 1 \right\} = \log K_M^{ap} - n \cdot \log [S] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $i_{\text{máx}}$ es la corriente máxima y n es el coeficiente de Hill que mide el grado de desviación de la reacción enzimática respecto a la cinética de Michaelis–Menten. Valores de este coeficiente próximos a la unidad indican una cinética ideal de tipo Michaelis–Menten [Iwuoha *et al.*, 1997].

Las enzimas pueden clasificarse fundamentalmente en seis grupos según el tipo de reacción catalizada [Shukla y Pletschke, 2013]. Entre ellas las más importantes para fines analíticos son las oxidoreductasas, seguidas por las hidrolasas y algunas liasas [Dzyadevych *et al.*, 2008]. Las enzimas redox catalizan reacciones que implican transferencia de electrones, produciendo la oxidación o reducción del sustrato. Esta transferencia de

5. ANTECEDENTES

electrones puede ser fácilmente detectada en la interfaz de los biosensores enzimáticos amperométricos, generando la señal analítica que deberá ser proporcional a la concentración de sustrato enzimático analizado.

Cuando se preparan biosensores enzimáticos amperométricos es importante determinar el efecto de las condiciones experimentales tales como el pH, la temperatura, el potencial aplicado y la agitación, sobre la señal analítica obtenida [Bartlett y Whitaker, 1987]. Asimismo, deben ser también considerados otros parámetros tales como el origen y la disponibilidad de la enzima, su estabilidad operacional y de almacenamiento, así como el procedimiento de inmovilización y las características del soporte (superficie del electrodo) [Bartlett y Whitaker, 1987; Dzyadevych *et al.*, 2008]. En este sentido, la tendencia actual en la tecnología de biosensores implica el uso de nanomateriales como elementos de transducción y soportes para la eficiente inmovilización de enzimas y otros biorreceptores sobre la superficie de los electrodos [Kurbanoglu *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2016; Saadaoui *et al.*, 2016].

5.1.2.4. Electrodo funcionalizado con nanomateriales

La nanotecnología consiste en el estudio, la manipulación, la creación y el uso de materiales, aparatos y sistemas en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en el rango de la nanoescala, es decir, entre 1 y 100 nanómetros [Ramsden, 2016]. Los nanomateriales, pilares fundamentales de la nanotecnología, se pueden clasificar en cuatro categorías (0D, 1D, 2D y 3D) de acuerdo a sus dimensiones. Estos nuevos materiales pueden prepararse con una gran diversidad de composición y morfologías en forma de nanopartículas, nanopolvos, nanotubos, nanocápsulas, nanocontenedores porosos, nanohilos o brochas, etc. [Guo y Tan, 2009]. En la **Figura 5.3** se representan diversos nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de los biosensores electroquímicos.

5. ANTECEDENTES

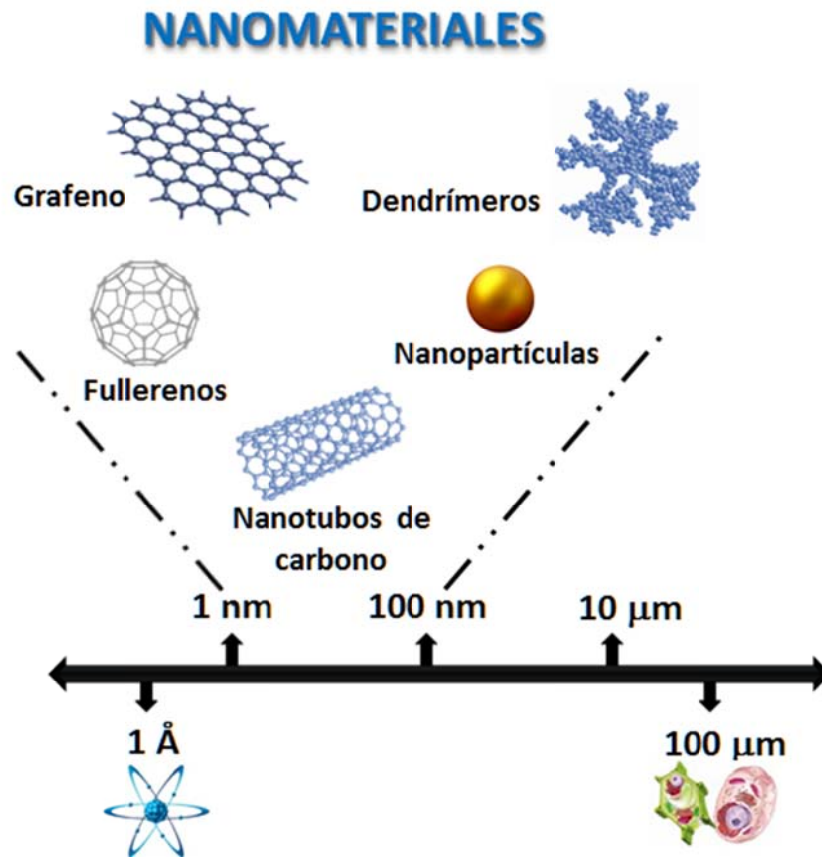


Figura 5.3. *Nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de los biosensores.*

Durante los últimos años el desarrollo de nanomateriales se ha convertido en uno de los campos de investigación más dinámicos en el área de la nanotecnología. Este interés alcanza también otras áreas de la ciencia como la química, la física, la biología y la ingeniería [Lahann, 2008; Dhathathreyan *et al.*, 2017; García y Su, 2016].

Durante la última década, la producción científica relacionada con el área de los nanomateriales ha evolucionado de manera espectacular. Este hecho ha estado condicionado por las prometedoras aplicaciones de estos nuevos materiales, así como por el carácter multidisciplinar de las investigaciones dedicadas a ellos que ha hecho converger el conocimiento de áreas anteriormente separadas y avanzar en nuevas aplicaciones. En la **Figura 5.4** se muestra una instantánea de la progresión del número de publicaciones sobre los nanomateriales desde el año 2000 hasta la actualidad. Como se puede observar, el

5. ANTECEDENTES

crecimiento se ha producido de forma continuada, con un aumento significativo en los últimos años.

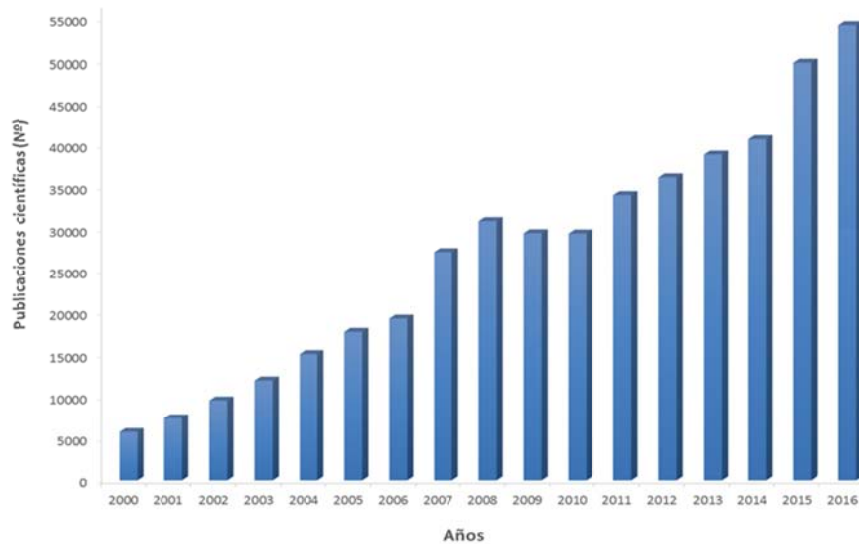


Figura 5.4. Número de publicaciones científicas sobre nanomateriales desde el año 2000 a la actualidad. (Fuente consultada: Web of Science, Abril 2017).

El diseño de nuevos materiales nanoestructurados y electroconductores, sobre los cuales sea factible la inmovilización eficiente y específica de biomoléculas de utilidad e interés analítico, constituye una de las tendencias científicas actuales orientada a la construcción de biosensores más sensibles, versátiles y robustos [Jia *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2016]. Esto se debe a las características únicas que presentan estos nuevos materiales, como son su elevada relación entre área superficial y volumen, la creación de microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas analíticas, y la posibilidad de reducir los límites de detección analítica al poseer mayores relaciones entre las corrientes faradaicas y capacitivas que aquellos electrodos no nanoestructurados. Asimismo, estos nanomateriales abren la posibilidad de realizar diseños específicos encaminados a la continua miniaturización y especialización de los sistemas biosensores [Song *et al.*, 2016].

5. ANTECEDENTES

Las estrategias empleadas para la preparación de electrodos funcionalizados con nanomateriales pueden clasificarse en dos grandes grupos [**Putzbach y Ronkainen, 2013**]:

1. Inclusión del nanomaterial dentro de la matriz electródica [**Karimi-Maleh et al., 2014; Jain et al., 2015; Dönmez et al., 2014**].
2. Modificación de la superficie del electrodo con el nanomaterial [**Cincotto et al., 2015; Araque et al., 2013; Borisova et al., 2015**].

Aunque la primera de estas metodologías destaca por su sencillez y reproducibilidad, es la nanoestructuración superficial de los electrodos la que proporciona una mayor versatilidad para el diseño de biosensores de arquitectura predefinida, ya que permite, entre otras mejoras [**Kumar et al., 2015; Holzinger et al., 2014, Zhu et al., 2014**]:

- Reducir los tiempos de respuesta analítica, debido a la aceleración que se produce de los procesos de transferencia electrónica entre los electrodos y las moléculas objeto del análisis.
- Reducir los límites de detección analítica, debido a que funcionan como ensamblados de nanoelectrodos y, por tanto, poseen una relación mayor entre la corriente faradaica y capacitiva que los electrodos no nanoestructurados.
- Disminución del valor del potencial de medida en los casos en que la estructura superficial de los nanomateriales contribuye a catalizar los procesos bioelectroquímicos que ocurren sobre los electrodos.
- Aumentar la estabilidad de los biosensores, ya que los nanoensamblajes tridimensionales sobre la superficie de los electrodos crean microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas.
- Diseñar una gran variedad de arquitecturas sobre los electrodos, ya que los nanomateriales pueden actuar como unidades de ensamblaje supramolecular con propiedades funcionales únicas.

5. ANTECEDENTES

El desarrollo de metodologías para la nanoestructuración de las superficies de los electrodos debe considerar una serie de factores, en aras de construir nuevos biosensores electroquímicos de mayor robustez y con un rendimiento bioanalítico mejorado [Yañez-Sedeño *et al.*, 2015]:

- El tipo de superficie a modificar,
- El nanomaterial que se utiliza,
- El método físico/químico empleado en la modificación de la superficie,
- Otros compuestos / materiales que podrían ser también empleados,
- La biomolécula a inmovilizar y el método para hacerlo, y
- La reacción electroquímica que tiene lugar en la superficie del electrodo funcionalizado.

Estas estrategias deben proporcionar interfaces eléctricas con nano- o micro-topología tridimensional que permita la inmovilización estable de las biomoléculas sin afectar su función biológica, favoreciendo además la generación rápida y eficiente de los procesos electroquímicos que participan en la reacción analítica sobre tales interfaces [Wang, 2005].

Un gran número y diversidad de nanomateriales han sido empleados como elementos de transducción para la construcción de electrodos nanoestructurados con fines bioanalíticos. Entre los más destacados deben citarse las nanopartículas metálicas (fundamentalmente de oro), los nanotubos de carbono, el grafeno y diversas nanoestructuras de óxidos metálicos [Kumar *et al.*, 2015].

5.2. Nanomateriales híbridos para la fabricación de plataformas biosensoras

5.2.1. Nanomateriales híbridos

Como se ha descrito en apartados anteriores, los nanomateriales poseen propiedades muy relevantes las cuales favorecen su aplicación en muchas áreas científicas y tecnológicas

5. ANTECEDENTES

[**Santhosh et al., 2016; Ahmadi et al., 2016; Shi y Zhang, 2016**]. Sin embargo, estos nuevos materiales poseen algunas características estructurales que actualmente limitan su mayor empleo en diversas aplicaciones.

En este sentido, la mayor preocupación de la comunidad científica internacional y la sociedad se centra en la posible toxicidad e impacto ambiental que puedan tener estos materiales a mediano y largo plazo [**Ema et al., 2016; Westmeier et al., 2016; El Yamani et al., 2017**]. Asimismo, la ausencia de grupos funcionales en la superficie de estos materiales modula sus propiedades de hidrofiliicidad/hidrofobicidad, limita su solubilidad o dispersabilidad en medios acuosos, y reduce su biocompatibilidad [**Yan et al., 2011; Guo et al., 2015**].

Desde un punto de vista bioanalítico, la falta de grupos funcionales superficiales en los nanomateriales limita la inmovilización estable de los biorreceptores mediante enlaces covalentes. Este hecho desfavorece la construcción de biosensores electroquímicos robustos y reproducibles [**Yañez-Sedeño et al., 2015**]. Por tal motivo, el desarrollo de nuevos nanomateriales funcionalizados constituye una premisa importante en la tecnología de los biosensores electroquímicos.

Las estrategias orientadas a introducir grupos funcionales en la superficie de los nanomateriales pueden agruparse en dos grandes grupos [**Yañez-Sedeño et al., 2015**]:

- Modificación química [**Biju, 2014; Karousis et al., 2010; Kang et al., 2016**].
- Hibridación con otros materiales [**Chauhan, 2011; Sánchez et al., 2011; Moreno-Guzman et al., 2016**].

Durante las últimas décadas se han establecido numerosos métodos de modificación superficial de nanomateriales empleando métodos químicos [**Biju, 2014; Karousis et al., 2010; Kang et al., 2016**], a partir de los cuales se ha podido preparar derivados con propiedades mejoradas. Sin embargo, y aunque en nuestra investigación se emplean métodos químicos de funcionalización de algunos nanomateriales, este trabajo de tesis ha

5. ANTECEDENTES

estado fundamentalmente orientado al diseño de nuevos nanomateriales híbridos para su empleo en la construcción de plataformas biosensoras electroquímicas. Por tal motivo, este apartado se centrará en este tipo de materiales.

Según la bibliografía, un **nanomaterial híbrido** o **nanhíbrido** se define como una combinación intencionada de al menos un nanomaterial, con uno o más materiales, a nivel atómico o nanométrico, complementándose cada uno de ellos para tener nuevas y/o mejoradas funciones y propiedades [Yañez-Sedeño *et al.*, 2015].

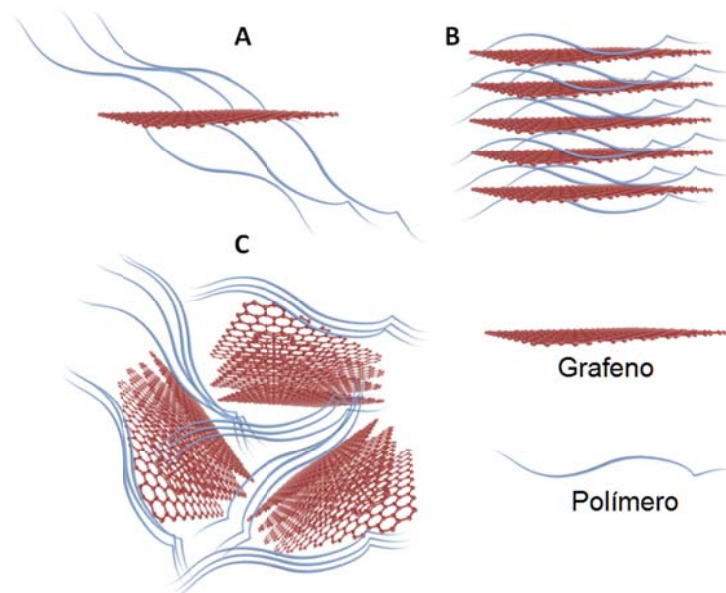


Figura 5.5. Representación esquemática de las diferencias estructurales entre un nanohíbrido de grafeno y polímero preparado mediante unión química (A) o interacción intersticial (B), y un material nanocompósito (C). [Yañez-Sedeño *et al.*, 2015].

Debe señalarse que existe una marcada diferencia entre un nanohíbrido y un nanomaterial compósito. En el caso de los compósitos, estos se obtienen mediante mezcla o combinación física de los materiales constituyentes, sin que medie entre ellos unión química alguna [Araby *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2009]. Por el contrario, en los nanomateriales híbrido existe unión química, o al menos interacción intersticial a nivel

5. ANTECEDENTES

atómico o nanométrico, que aseguran una mayor interrelación entre los materiales constituyentes [Yañez-Sedeño *et al.*, 2015]. Este alto grado de interacción hace que los nanohíbridos presenten propiedades sinérgicas o completamente nuevas, las cuales no representan solo la suma de las propiedades presentadas por los materiales constituyentes.

En la **Figura 5.5** se ejemplifica la diferencia estructural que existe entre un nanomaterial compuesto y un nanohíbrido.



Figura 5.6. Clasificación de los nanomateriales híbridos.

Los nanomateriales híbridos pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de los materiales que lo componen. Asimismo, se pueden clasificar de acuerdo al número de materiales constituyentes empleados en su preparación. En la **Figura 5.6** se muestran estas clasificaciones.

En el presente trabajo se desarrollaron 3 tipos diferentes de nanomateriales híbridos, basados en derivados de grafeno, nanopartículas anisotrópicas tipo Janus y polímeros de coordinación. Estos nuevos materiales se emplearon como elementos de transducción para

5. ANTECEDENTES

la construcción de biosensores amperométricos enzimáticos con potenciales aplicaciones en el análisis de alimentos.

5.2.2. Nanomateriales híbridos de grafeno

El empleo de los nanomateriales de carbono como elementos de transducción en el diseño de biosensores electroquímicos constituye un área de investigación que ha crecido de forma exponencial durante los últimos años. Esta tendencia tiene su origen en el descubrimiento de los fullerenos en 1985 por Kroto [Kroto *et al.*, 1985], y ha sido potenciada por el posterior descubrimiento de los nanotubos de carbono por Iijima en 1991 [Iijima, 1991], y del grafeno en 2004 por Geim y Novoselov [Novoselov *et al.*, 2004].

En la **Figura 5.7** se muestra una representación esquemática de la estructura de estos nanomateriales de carbono.

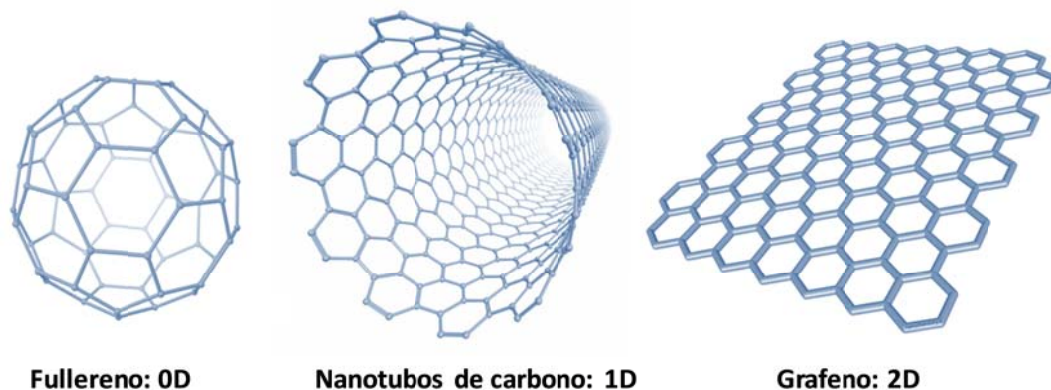


Figura 5.7. *Nanomateriales de carbono más empleados en bioelectroanálisis.*

Las excelentes propiedades físico-químicas de cada una de estas formas alotrópicas del carbono, las cuales están directamente relacionadas con su geometría y disposición espacial, han creado grandes expectativas en cuanto a sus posibles aplicaciones. Desde el punto de vista estructural, tanto los fullerenos como los nanotubos de carbono presentan estructuras que se pueden construir a partir de una lámina de grafeno. Éste último se define como una

5. ANTECEDENTES

única lámina bidimensional de grafito de tamaño finito, con multitud de átomos de carbono que presentan enlaces con altos estados energéticos.

El grafeno, cuyo aislamiento por primera vez en 2004 fue objeto de la concesión del Premio Nobel de Física en 2010 [**Novoselov et al., 2004**], está considerado como el “material del futuro” debido a sus inusuales propiedades. Estas propiedades están derivadas de su estructura molecular de anillos condensados de seis carbonos bidimensionales con hibridación sp_2 dispuestos en monocapas aisladas unas de otras.

Las propiedades del grafeno se ven afectadas por el número de capas que posea el material. Muchos de los métodos de fabricación actuales se basan en modificaciones realizadas sobre grafito, pero la elevada energía de interacción entre las capas hace que sea muy complejo producir de esta forma capas individuales de grafeno. En consecuencia, el término grafeno puede incluir desde una a varias capas apiladas y unidas mediante fuerzas de Van der Waals e interacciones entre orbitales π . Esto se traduce en que en la bibliografía se puedan encontrar términos como el de grafeno de una sola capa, doble capa o bicapa, grafeno de pocas capas (generalmente entre 3 y 9) y grafeno multicapa (entre 9 y 12 capas) [**Allen et al., 2010**]. A partir de unas 12 capas, el material tiende a un comportamiento más parecido al grafito.

El grafeno es un material prácticamente transparente, más de cien veces más fuerte que el acero, y muy flexible. Al mismo tiempo muestra una excelente conductividad térmica y eléctrica, lo que lo convierte en buen material para aplicaciones en electrónicas como son la fabricación de pantallas delgadas, circuitos flexibles, componentes de procesamiento rápido, baterías y supercapacitores [**Hyun et al., 2013; Hong et al., 2016; Li et al., 2016; Ambrosi y Pumera, 2016**].

Desde el punto de vista analítico, el grafeno constituye uno de los nanomateriales más prometedores y novedosos para el diseño de nuevos sistemas sensores y biosensores electroquímicos [**Shao et al., 2010**]. Sin embargo, la ausencia de grupos funcionales en su

5. ANTECEDENTES

estructura limita su solubilidad y posibilidad de ser empleado como soporte para la inmovilización de biorreceptores analíticos.

Por este motivo, la mayor parte de las investigaciones relacionadas con el uso de este nanomaterial en la tecnología de biosensores electroquímicos emplean el óxido de grafeno como material de partida [Shao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a].

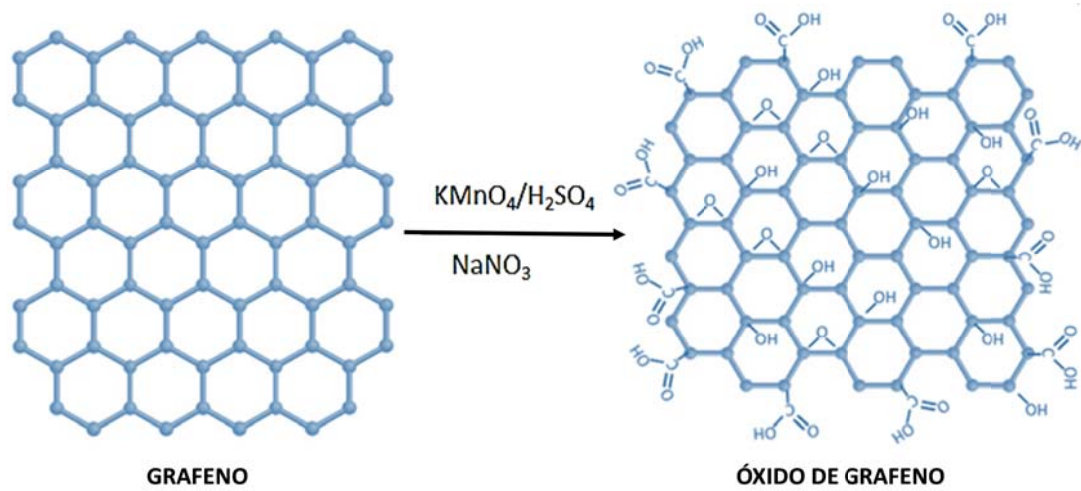


Figura 5.8. Preparación de óxido de grafeno por el método de Hummers.

El óxido de grafeno es un derivado fuertemente oxidado, con una proporción C/O por encima de 2. A diferencia del grafeno, no presenta unas propiedades electroquímicas o electrocatalítica muy marcadas, debido a los grupos carboxílicos, hidroxilos y epóxidos unidos al grafeno que provocan una pérdida de aromaticidad y, en consecuencia, una pérdida significativa de la conductividad [Eda y Chhowalla, 2010].

La oxidación del grafeno se realiza habitualmente siguiendo el método de Hummers [Hummers y Offeman, 1958], consistente en una oxidación del grafeno con permanganato de potasio y nitrato de sodio en ácido sulfúrico concentrado (Figura 5.8).

Los grupos funcionales oxigenados favorecen la exfoliación del óxido de grafeno, ya que no sólo inducen un aumento en su distancia interlaminar, sino que también confieren carácter hidrófilo y polar a las láminas. Ello hace posible la exfoliación del nanomaterial en

5. ANTECEDENTES

agua y algunos disolventes polares mediante ultrasonidos o agitación prolongada, dando lugar a láminas monocapa de óxido de grafeno en dispersión coloidal estable.

Los grupos funcionales oxigenados de las láminas de óxido de grafeno pueden ser parcial o totalmente reducidos mediante métodos químicos o electroquímicos [Dreyer *et al.*, 2010; Araque *et al.*, 2013]. Mediante estos procesos se puede recuperar significativamente la hibridación sp^2 original del material y mejorar las propiedades electrónica [Gómez-Navarro *et al.*, 2007; Dreyer *et al.*, 2010]. Por lo tanto, la reducción de óxido de grafeno proporciona un material que, si bien no se puede considerar igual que el grafeno, presenta buena conductividad, estabilidad térmica y capacidad de procesamiento.

Otra ventaja del óxido de grafeno es la facilidad con la cual puede ser derivatizado mediante métodos químicos [Dreyer *et al.*, 2010], dando la posibilidad de preparar nuevos derivados funcionalizados o nanohíbridos.

Tanto el grafeno como el óxido de grafeno pueden combinarse con otros materiales, orgánicos o inorgánicos, para producir nanomateriales híbridos con nuevas propiedades físico-químicas. Estos nuevos materiales pueden ser preparados mediante [Dreyer *et al.*, 2010]:

- **Uniones covalentes:** Pueden llevarse a cabo mediante reacciones de Diels-Alder, injertos con sales de diazonio, cicloadición, etc. El óxido de grafeno puede ser modificado mediante reacción de los grupos oxigenados del material de carbono con grupos nucleofílicos (amino, hidroxilo, silano, isocianato, etc.).
- **Uniones no covalentes:** Las más comunes son las interacciones de tipo π - π con compuestos aromáticos como los derivados de pireno.
- **Intercalación:** Entre las capas de grafeno pueden intercalarse moléculas poliméricas, otros nanomateriales, etc.

A partir de estos procedimientos pueden prepararse dos tipos de materiales híbridos de grafeno [Dreyer *et al.*, 2010; Loh *et al.*, 2010]:

5. ANTECEDENTES

- **Materiales híbridos con compuestos orgánicos**, en los que el grafeno se combina con polímeros, materiales orgánicos porosos, compuestos organometálicos (MOFs), etc.
- **Materiales híbridos inorgánicos**, en los que el grafeno se combina con especies inorgánicas metálicas y no metálicas, normalmente en forma de nanopartículas.

5.2.2.1. Nanomateriales híbridos de grafeno y nanopartículas metálicas

Una de las clases de nanohíbridos más importantes para la construcción de biosensores enzimáticos son aquellos que combinan un derivado de grafeno con nanopartículas metálicas [Pumera, 2011; Hong *et al.*, 2010]. Este hecho se debe a que las nanopartículas metálicas, fundamentalmente de metales nobles, poseen excelentes propiedades que favorecen su uso como elementos de transducción en la tecnología de los biosensores [Pingarrón *et al.*, 2008].

En este sentido, las nanopartículas metálicas presentan alta conductividad eléctrica, lo cual favorece la rápida ocurrencia de procesos de transferencia electrónica en la superficie de los electrodos. Estas nanopartículas presentan además una alta afinidad por las moléculas proteicas, y una elevada relación entre el área superficial y el volumen. Estas características favorecen la inmovilización de una alta densidad de moléculas biorreceptoras en su superficie, lo cual tiene una importancia vital en el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas [Yañez-Sedeño y Pingarrón, 2005; Pingarrón *et al.*, 2008].

Una de las características más importantes de estas nanopartículas, consecuencia directa de su pequeño tamaño y alta conductividad eléctrica, es la alta densidad de electrones sobre su superficie. Este hecho favorece la transferencia directa de electrones entre el centro redox en el sitio activo de las enzimas y el material del electrodo, a través de mecanismos de efecto túnel, lo que permite el desarrollo de los biosensores llamados de tercera generación que no precisan de la utilización de mediadores químicos [Li *et al.*, 2010b].

5. ANTECEDENTES

Adicionalmente, las nanopartículas metálicas pueden ser fácilmente funcionalizadas con ligandos tiolados, lo cual permite la preparación de una gran variedad de derivados capaces de ser empleados como sustratos para la inmovilización covalente de las enzimas. Asimismo, la posibilidad de preparar nanopartículas con tamaño y funcionalidad química bien definidas permite el ensamblaje de arquitecturas tridimensionales estables sobre la superficie de los electrodos [Luo *et al.*, 2006].

Se ha demostrado que muchas nanopartículas metálicas poseen actividad catalítica frente a diferentes compuestos de interés electroanalítico, tales como NADH, H₂O₂ y O₂. Esta propiedad favorece la construcción de dispositivos bioanalíticos capaces de operar a bajos valores de potencial, lo cual reduce el posible efecto de sustancias interferentes [Kang *et al.*, 2008].

Las nanopartículas de metales nobles poseen baja reactividad química, así como elevados valores de potencial de oxidación; por lo tanto, estos nanomateriales no interfieren en las mediciones electroquímicas. Debe destacarse que estos nanomateriales pueden ser preparados a partir de diferentes estrategias, generalmente poco complejas y muy reproducibles [Yañez-Sedeño y Pingarrón, 2005; Pingarrón *et al.*, 2008]. En general, las propiedades electromagnéticas, ópticas y catalíticas de las nanopartículas de metales nobles están fuertemente influenciadas por la forma y tamaño de las mismas; por tal motivo, es de primordial importancia la selección del método a emplear para su preparación, en aras de favorecer un mejor control de sus propiedades [Yeh *et al.*, 2012].

En las **Tablas 5.1** se describen algunos de los trabajos descritos en la bibliografía durante los últimos años, en los que se han construido biosensores electroquímicos enzimáticos basados en electrodos nanoestructurados con diversos nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas. Las nanopartículas metálicas más comúnmente empleadas para estos fines son las de metales nobles, como Au, Ag, Pd y Pt. En general, los biosensores preparados con este tipo de nanohíbridos presentan las ventajas proporcionadas por la sinergia de los nanomateriales de partida, y muestran excelentes propiedades analíticas, estabilidad y reproducibilidad.

5. ANTECEDENTES

Tabla 5.1. Biosensores enzimáticos preparados con nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas.

Metal	Electrodo	Método de Preparación	Analito	Referencia
Au	AChE/AuNP/rGO/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Paraoxón	[Wang et al., 2011b]
Au	AChE/Au-PPy-rGO/GCE	Electrodeposición	Paraoxón	[Yang et al., 2014]
Au	HRP/AuNP/QD/rGO-AuNP/GCE	Reducción <i>in situ</i>	H ₂ O ₂	[Zhiguo et al., 2011]
Au	HRP/AuNP-Fe ₃ O ₄ /GF-NF/SPE	Reducción <i>in situ</i>	H ₂ O ₂	[Xin et al., 2013]
Au	GOx/AuNP/GF/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Glucosa	[Chen et al., 2011]
Au	GOx/ NF/rGO-AuNP/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Glucosa	[Baby et al., 2010]
Au	GOx/AuNP/rGO/MCNT/GCE	Intercalación	Glucosa	[Yu et al., 2014]
Au	Tir-AuNP/GO/SPE	Unión covalente	Catecol	[Song et al., 2011]
Au	Hb/AuNP/rGO-CS/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Nitrito	[Jiang et al., 2014]
Ag	GOx/AgNP/SiO ₂ /GO/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Glucosa	[Lu et al., 2011]
Ag	SOx/AgNP/GF-CS/GCE	Electrodeposición	H ₂ O ₂	[Zhou et al., 2012]
Pt	ChO/ChE/PtNP/rGO/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Colesterol	[Dey y Raj, 2010]
Pt	GOx/PtNP/PAMAM-rGO/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Glucosa	[Araque et al., 2014]
Pt	GOx/PtNP/MGPN/Si	Electrodeposición	Glucosa	[Claussen et al., 2012]
Pd	GOx/PdNP/CS-rGO/GCE	Reducción <i>in situ</i>	Glucosa	[Zeng et al., 2011]

AChE: acetilcolina esterasa; **AuNP:** nanopartículas de Au; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **PPy:** polipirrol; **HRP:** peroxidasa de rábano; **QD:** puntos cuánticos de CdTe-CdS; **Fe₃O₄:** nanopartículas de Fe₃O₄; **GF:** grafeno; **NF:** Nafión; **SPE:** electrodo serigrafado de carbono; **GOx:** glucosa oxidasa; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **Tir:** tirosinasa; **GO:** óxido de grafeno; **Hb:** hemoglobina; **CS:** quitosano; **AgNP:** nanopartículas de Ag; **SiO₂:** nanopartículas de SiO₂; **ChO:** colesterol oxidasa; **ChE:** colesterol esterasa; **PtNP:** nanopartículas de Pt; **SOx:** sarcosina oxidasa; **PAMAM:** dendrímero de poliamidoamina G-4; **MGPN:** nanopétalos de grafeno multicapa; **Si:** electrodo de silicio; **PdNP:** nanopartículas de paladio.

5. ANTECEDENTES

Como se aprecia en esta tabla, la mayor proporción de los biosensores enzimáticos construidos con nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas emplean nanopartículas de oro [Wang *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2014; Zhiguo *et al.*, 2011; Xin *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2011; Baby *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2014], lo cual se justifica por la menor reactividad química de este metal, y su alto valor de potencial de oxidación.

Asimismo, la mayor proporción de biosensores aquí descritos basan su fundamento analítico en la detección de H₂O₂, ya sea como analito directo [Zhiguo *et al.*, 2011; Xin *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2012], o como producto de la reacción de la enzima oxidasa inmovilizada sobre la superficie electródica [Chen *et al.*, 2011; Baby *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2011; Dey y Raj, 2010; Araque *et al.*, 2014a; Claussen *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2011]. Este hecho se justifica por la alta actividad electrocatalítica de las nanopartículas de metales nobles ante la descomposición del H₂O₂.

5.2.2.2. Nanomateriales híbridos de grafeno y polímeros

La unión covalente de polímeros a derivados de grafeno representa una alternativa interesante para el desarrollo de novedosos nanohíbridos para su uso como elementos de transducción en la construcción de biosensores electroquímicos, supercapacitores y catalizadores [Byun *et al.*, 2011; Yu y Dai, 2009; Cai y Song, 2010; Araque *et al.*, 2014b]. En este sentido, los nanohíbridos basados en grafeno y polímeros presentan numerosas ventajas destacando la estabilidad mecánica, mejora de la dispersión del material de carbono y la disponibilidad de grupos reactivos en las cadenas de polímeros, lo cual facilita la inmovilización estable y a gran escala de biomoléculas [Cai y Song, 2010; Araque *et al.*, 2014b].

En especial, la combinación de grafeno con biopolímeros hidrosolubles permite incrementar la hidrofiliidad de este nanomaterial de carbono, solventando varios de los problemas presentados por este nanomaterial para su uso en tecnología de biosensores [Artiles *et al.*, 2011]. En este sentido, la modificación covalente del grafeno con polisacáridos

5. ANTECEDENTES

ha sido propuesta como una vía fácil y económicamente factible de producir materiales novedosos capaces de formar dispersiones estables en medios acuosos. Esto facilita la inmovilización estable y a gran escala de las biomoléculas receptoras, dando lugar tanto a una mejor sensibilidad y selectividad de los biosensores como a un aumento de la estabilidad de los mismos [Araque *et al.*, 2013; Borisova *et al.*, 2015].

Para conseguir un anclaje eficiente de los polímeros a la superficie basal del grafeno oxidado, es conveniente introducir en el nanomaterial grupos funcionales muy reactivos, capaces de proporcionar un buen rendimiento en la unión de tipo covalente. El grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral ha desarrollado un método de modificación selectiva de los grupos hidroxilo basales, mediante reacción con diferentes alcoxisilanos convenientemente funcionalizados [Araque *et al.*, 2013; Araque *et al.*, 2014b; Borisova *et al.*, 2015]. Esta estrategia permite el anclaje multipuntual de polímeros sobre el plano basal del nanomaterial, aumentando su capacidad de dispersión en medios acuosos sin afectar sensiblemente las propiedades electroconductoras del grafeno.

En trabajos anteriores se ha descrito la modificación de óxido de grafeno con dendrímeros de poliamidoamina [Araque *et al.*, 2013] y polisacáridos aniónicos [Araque *et al.*, 2014b; Borisova *et al.*, 2015]. En nuestra investigación hemos propuesto el uso de un derivado de quitosano hidrosoluble como agente de modificación del óxido de grafeno. Asimismo, hemos descrito una metodología para el anclaje monopuntual de dextrano sobre el plano basal de este nanomaterial.

5.2.2.2.1. Polímeros de quitosano

El quitosano es un polímero catiónico que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (Figura 5.9). Tanto la quitina como el quitosano son aminoglucopiranos de cadenas lineales, constituidos por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1-4)$ [Kumar, 2000; Rinaudo, 2006].

5. ANTECEDENTES

El quitosano se obtiene a partir de la quitina por desacetilación de un porcentaje variable de los residuos de *N*-acetilglucosamina, por lo que se considera un copolímero de *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina en el que tanto la longitud de la cadena polimérica como el grado de desacetilación y degradación química contribuyen decisivamente a las propiedades de la molécula [Younes y Rinaudo, 2015].

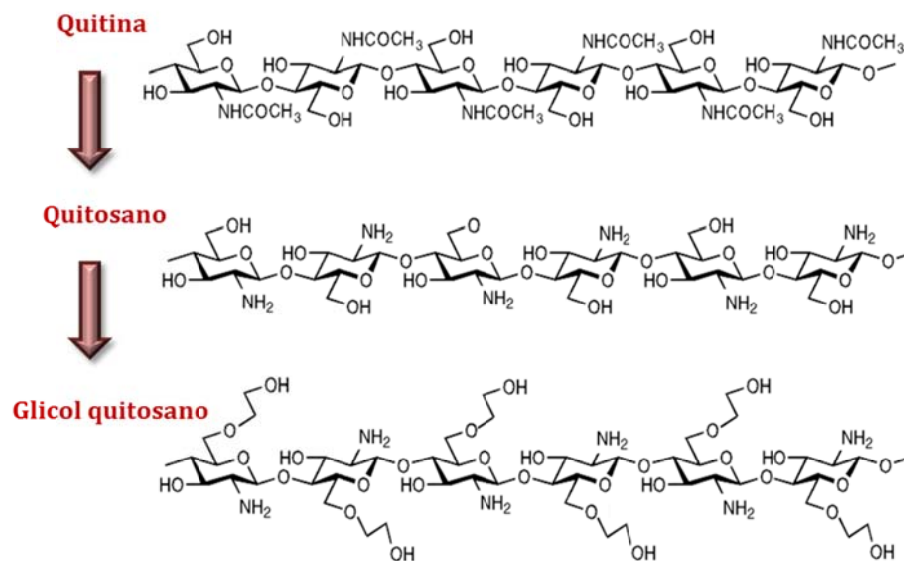


Figura 5.9. Estructura de los polisacáridos quitina, quitosano y glicolquitosano.

Algunas de las propiedades funcionales más importantes del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante [Rinaudo, 2006; Koide, 1998; Leceta et al., 2013]. Debido a sus propiedades, este polímero ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de biosensores electroquímicos [Warner y Andreescu, 2016; Suginta et al., 2013; Zhao et al., 2015; Hernández-Ibáñez et al., 2016], demostrándose que puede ser utilizado para estabilizar proteínas [Calvo et al., 1997].

El quitosano es muy poco soluble en agua, pero la presencia de los grupos amino permite su solubilización en disoluciones ácidas al protonarse las unidades de glucosamina. Cuando el pH aumenta hasta pH neutro, las moléculas de quitosano se neutralizan y precipitan en el

5. ANTECEDENTES

medio, lo que puede constituir un problema a la hora de emplearlo en combinación con otras moléculas. Para solucionar este inconveniente, se han sintetizado una gran variedad de derivados que presentan características y aplicaciones diferenciadas [Alves y Mano, 2008; Picola *et al.*, 2016; Elkholy *et al.*, 2014].

Uno de los derivados sintéticos más interesantes es el glicolquitosano, que presenta un grupo éter formado por reacción entre el hidroxilo primario en la posición C6 y una molécula de etilenglicol. Este compuesto posee interesantes propiedades desde el punto de vista de su utilidad en medios biológicos, ya que es citocompatible, viscoso, y se solubiliza en agua a pH ácido o neutro [Danielsen y Danielsen, 2017; Mandracchia *et al.*, 2017].

En la **Figura 5.9** se representa la estructura de este derivado, así como de los polisacáridos a partir de los cuales es preparado. Los grupos aminos libres del quitosano y el glicolquitosano le confieren propiedades importantes a estos polisacáridos [Carreño-Gómez y Duncan, 1997]. Cuando estos se solubilizan en ácido diluido funcionan como polímeros catiónicos de estructura lineal con una alta densidad de carga positiva, la cual puede ser aplicada en procesos de floculación, en la formación de capas o en la inmovilización de reactivos biológicos, incluyendo enzimas.

No obstante el amplio uso del quitosano en el diseño de biosensores electroquímicos, el uso de su derivado glicolquitosano no ha sido estudiado con anterioridad. Asimismo, tampoco se ha descrito el uso de este derivado hidrosoluble del quitosano para la preparación de nanomateriales híbridos derivados del grafeno.

5.2.2.2.2. Polímeros de dextrano

El dextrano es un polisacárido de alto peso molecular, compuesto de unidades de D-glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos α -(1-6) (**Figura 5.10**) [Neely, 1961]. Es un polisacárido natural, biocompatible, y con excelente solubilidad en agua [De Groot *et al.*, 2001].

5. ANTECEDENTES

Como ocurre con otros polímeros y oligómeros derivados de monosacáridos, los grupos hidroxilo presentes en la estructura son los responsables de la elevada solubilidad en agua. Otras propiedades importantes de este polímero son su alta hidrofiliicidad, volumen hidrodinámico, capacidad de proporcionar viscosidad y de actuar como agente floculante, su bajo coste y facilidad de modificación [Heinze *et al.*, 2006].

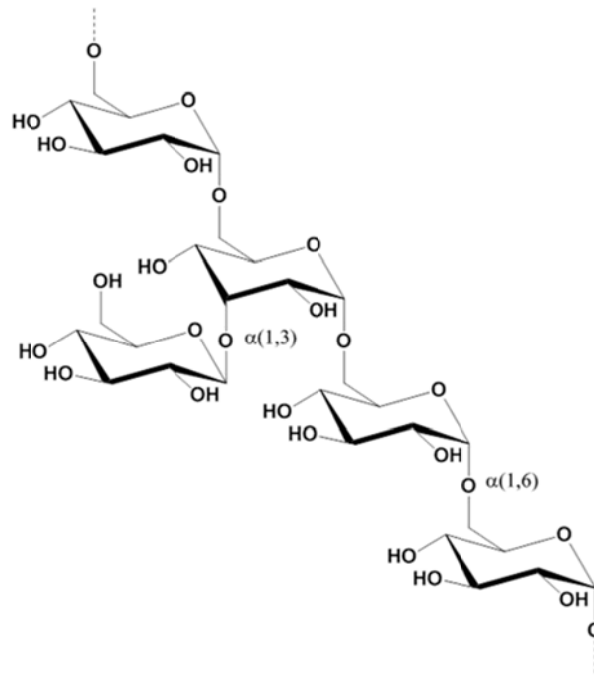


Figura 5.10. Estructura del polisacárido dextrano

Este polisacárido y muchos de sus derivados se emplean en diversas aplicaciones biomédicas, como expansores del plasma sanguíneo [Tam *et al.*, 1975], sustitutos del agente anticoagulante sulfato de heparina [Ricketts, 1952], y como portadores de medicamentos en forma de hidrogeles, nanopartículas y cápsulas [Lian *et al.*, 2017; Rai *et al.*, 2016; Alibolandi *et al.*, 2017; Chaiyasan *et al.*, 2017]. Los derivados de dextrano han sido asimismo muy utilizados en la preparación de matrices para cromatografía [Ó'Fágáin *et al.*, 2017], estabilizadores de enzimas y otras proteínas [Valdivia *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2003], y en el desarrollo de sistemas biosensores [Ou *et al.*, 2015; Satvekar *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017].

5. ANTECEDENTES

Aunque este polímero ha sido previamente utilizado para mejorar la estabilidad y biocompatibilidad de diversos nanomateriales de carbono, incluido el grafeno y el óxido de grafeno reducido [Zhang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016], la estrategia de funcionalización desarrollada en nuestro trabajo no ha sido antes descrita en la bibliografía.

5.2.3. Nanopartículas anisotrópicas tipo Janus

Las nanopartículas tipo Janus son un tipo especial de partículas que presentan dos superficies diferenciadas con distintas propiedades físicas y químicas [Lattuada y Hatton, 2011; Pradhan *et al.*, 2007]. Estos nanomateriales se denominan así en referencia al dios Jano (en latín *Janus, Ianus*) de la mitología romana, considerado el dios de las puertas, los comienzos y los finales, y que se representa con dos caras, mirando hacia ambos lados de su perfil (Figura 5.11).

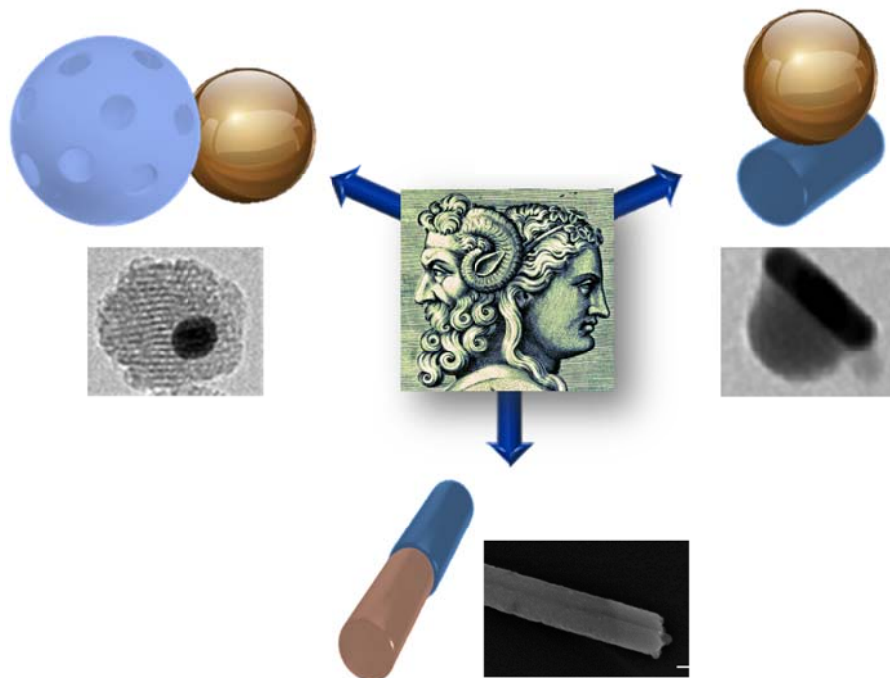


Figura 5.11. Nanomateriales anisotrópicos tipo Janus.

5. ANTECEDENTES

El modelo más simple de una nanopartícula Janus es una combinación de dos nanopartículas fabricadas con materiales diferentes (metal y sílice, por ejemplo), o que presentan en su superficie grupos funcionales distintos (grupos hidrofóbicos e hidrofílicos) [Walther y Müller, 2013]. De esta forma, la combinación de ambas proporciona a la partícula Janus propiedades únicas derivadas de su naturaleza asimétrica, y permite diseñar a partir de ella la arquitectura de novedosos dispositivos a escala nanométrica [Song y Chen, 2014].

La investigación en nanopartículas Janus se ha desarrollado en los últimos años como consecuencia de la búsqueda de nuevas estrategias sintéticas de materiales complejos que puedan generar nano- o micro-objetos estructurados e inteligentes, en los cuales las interacciones moleculares y reacciones en cascada se favorecen por la cercanía de las superficies anisotrópicas. Generalmente, las nanopartículas Janus pueden ser obtenidas mediante tres rutas diferentes de preparación: enmascaramiento, separación de fase y autoensamblaje [Lattuada y Hatton, 2011; Perro *et al.*, 2005; Tang y Kotov, 2005].

Como se observa en la **Figura 5.12**, el primer grupo se obtiene a través de una estrategia de enmascaramiento, mediante la cual las nanopartículas de un material se sumergen en un medio bifásico y quedan atrapadas en la interfase. De esta forma, la posterior modificación de la superficie de las nanopartículas se produce únicamente en una de las caras [Lattuada y Hatton, 2011; Perro *et al.*, 2005; Tang y Kotov, 2005].

El segundo grupo se sintetiza vía autoensamblaje, como ocurre en los polímeros en bloque y mezclas de ligandos que pueden mostrar adsorción competitiva en las superficies de las nanopartículas. Por último, la preparación del tercer grupo se basa en la separación de fases de dos sustancias diferentes, normalmente dos polímeros, o un polímero y un material inorgánico [Lattuada y Hatton, 2011; Perro *et al.*, 2005; Tang y Kotov, 2005].

En nuestro grupo de investigación se ha descrito la preparación, mediante el método de enmascaramiento, de nanopartículas Janus compuestas por una unidad de oro y otra de sílice mesoporosa, capaces de ser funcionalizadas de forma diferenciada a través de ligandos

5. ANTECEDENTES

provistos de grupos tiol y alcoxisilano respectivamente.

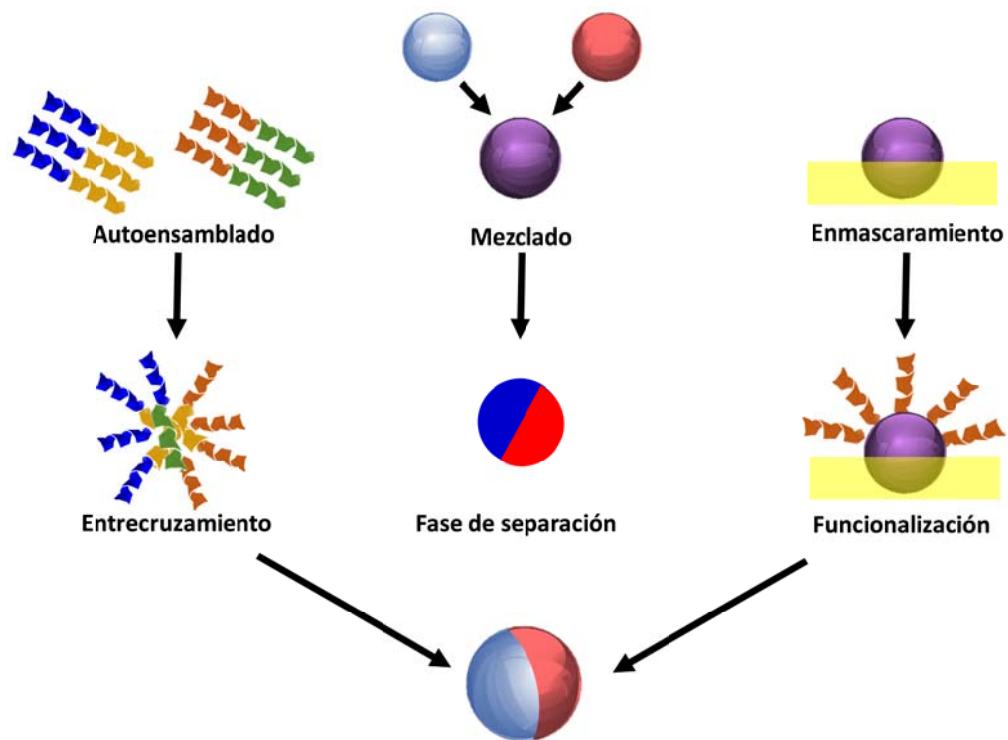


Figura 5.12. Representación de las tres vías principales de obtención de nanopartículas Janus: enmascaramiento, separación de fase y autoensamblaje.

Entre otras aplicaciones, estas partículas han sido empleadas para desarrollar una nanomáquina estímulo-dependiente capaz de liberar un cargo retenido en los poros de la partícula de sílice mesoporosa en respuesta a una disminución de pH [Díez et al., 2014]. Como se observa en la **Figura 5.13**, el mecanismo se basa en el anclaje de dos enzimas diferentes, glucosa oxidasa y esterasa, en la superficie de la nanopartícula de oro, la cual actúa como unidad de control de la nanomáquina. En presencia tanto de D-glucosa como de un éster como el acetato de butilo se genera en dicha unidad de control una disminución del pH, que provoca la protonación del benzimidazol que actúa como nanoválvula permitiendo así la salida del cargo.

5. ANTECEDENTES

Este modelo de nanopartículas Janus ha sido empleado con éxito en otros sistemas de liberación de fármacos [Villalonga *et al.*, 2013], pero no ha sido descrita su utilización como unidad de construcción en la fabricación de biosensores enzimáticos nanoestructurados.

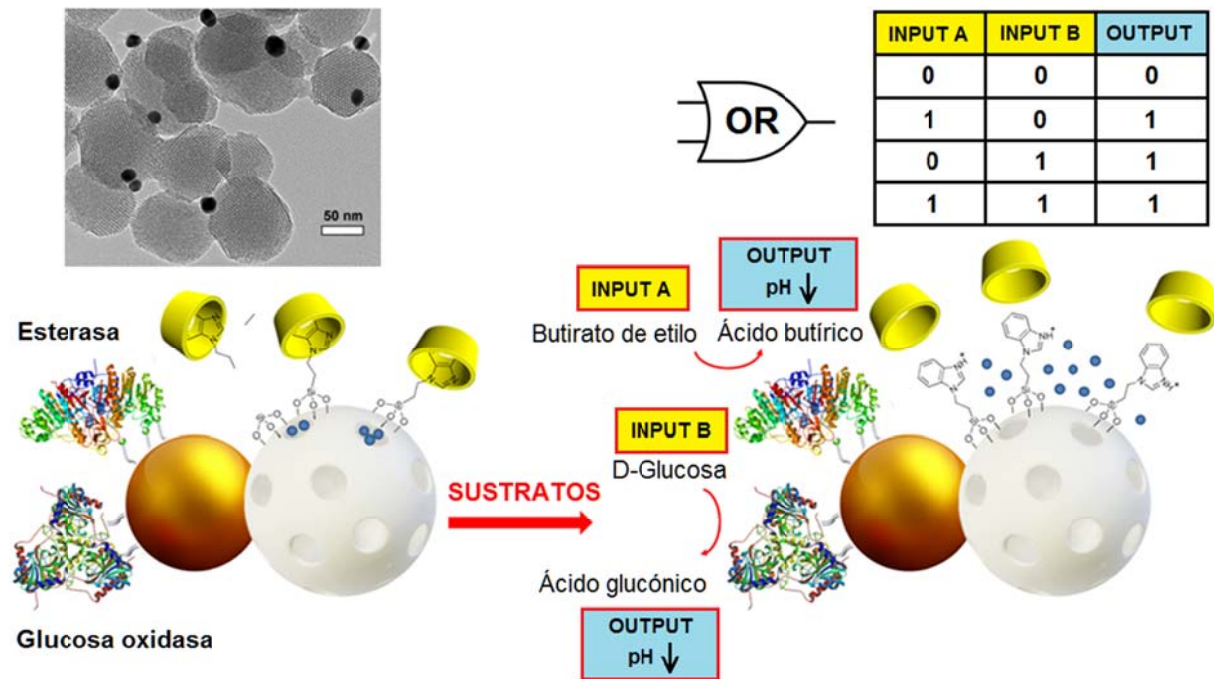


Figura 5.13. Nanomáquina estímulo-dependiente basada en nanopartículas Janus de *Au-sílice mesoporosa* [Díez *et al.*, 2014].

5.2.4. Nanomateriales basados en polímeros de coordinación

Un tipo de material que está atrayendo la atención dentro del ámbito de la investigación en los últimos tiempos son los polímeros de coordinación, los cuales implican la formación de complejos organometálicos entre un catión metálico y un ligando orgánico di- o poli-funcionalizado con carácter electrodonador. Estos polímeros de coordinación consisten en compuestos metal-ligando que se pueden repetir de manera ilimitada formando estructuras en una, dos o tres dimensiones (Figura 5.14).

En general, el proceso de formación de estos polímeros se da de manera automática por autoensamblaje, produciéndose materiales con distinta morfología y tamaño, que va desde

5. ANTECEDENTES

la nanoescala hasta polímeros de tamaño macroscópico [Janiak, 2003; Masoomi y Morsali, 2012; Spokoyny *et al.*, 2009].

Existen numerosos métodos de síntesis para la obtención de polímeros de coordinación, incluyendo síntesis hidrotérmal, procesos sol-gel, electrólisis de sales metálicas, deposición química de vapor, etc. Toda esta variedad de técnicas permite controlar de manera más exhaustiva la composición, tamaño y morfología de los materiales preparados [Masoomi y Morsali, 2012].

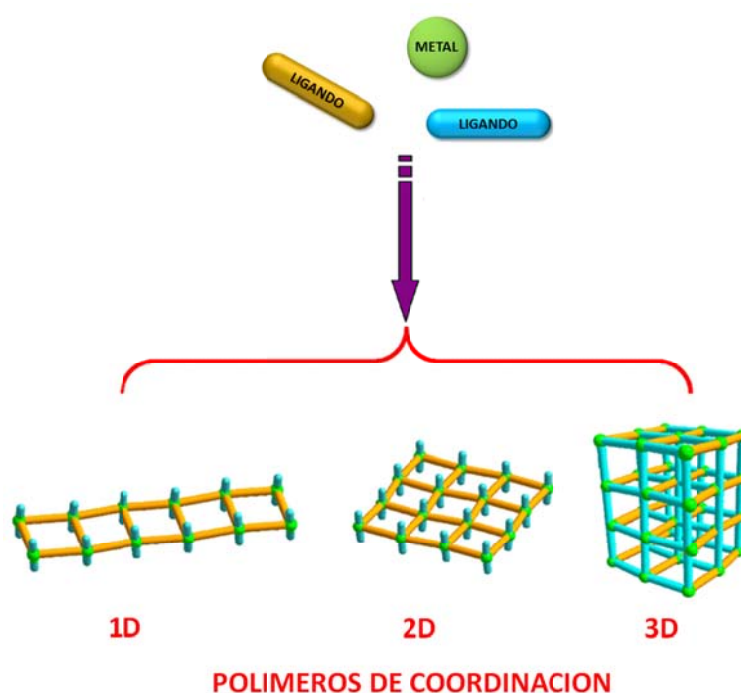


Figura 5.14. *Diferentes morfologías de nanomateriales basados en polímeros de coordinación.*

Este tipo de materiales pueden formar puentes π - π deslocalizados cuando se emplean ligandos poliaromáticos, lo que aporta una vía efectiva para la transferencia electrónica que se traduce en unas interesantes propiedades conductoras [Liu *et al.*, 2005]. Teniendo en cuenta estas interacciones, es posible obtener este tipo de materiales con la estructura deseada en función del ligando empleado, así como del catión metálico. Estos materiales

5. ANTECEDENTES

presentan unas interesantes propiedades para su aplicación en sistemas ópticos y electrónicos, principalmente.

Se ha demostrado además que las propiedades de estos polímeros dependen estrechamente de factores estructurales, de la naturaleza del ion metálico y la relación metal-ligando, por lo que se ha tratado de trabajar con distintos metales o con ligandos más complejos que permitan controlar la morfología del polímero, con el fin de obtener las propiedades deseadas [Zhao *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2012]. En este sentido, se ha descrito el empleo de numerosos ligandos en la obtención de este tipo de materiales, lo que permite que el abanico de aplicaciones de los mismo sea muy amplio, donde cabe destacar las relacionadas con catálisis, quiralidad, luminiscencia, conductividad magnetismo, etc. [Janiak, 2003].

Dentro de los polímeros de coordinación, cabe destacar los “MOFs” (Metal-organic frameworks) como una subclase donde la característica que les diferencia del resto es la porosidad que presentan, lo cual permite incrementar las aplicaciones de estos polímeros de coordinación, principalmente en cuanto a almacenamiento de gases, purificación de gases, separación de compuestos quirales, en el desarrollo de sensores y supercapacitadores, así como en la liberación controlada de fármacos [James, 2003]. El mayor interés que han despertado los MOFs para determinadas aplicaciones viene dado por esa porosidad, que implica una mayor superficie específica, que junto a la alta relación metal/ligando, resulta en una elevada presencia de sitios catalíticos activos [Czaja *et al.*, 2009].

Uno de los ligandos más empleados en la obtención de polímeros de coordinación es la 4,4'-bipiridina, así como derivados que incluyen distintos espaciadores entre los dos grupos piridina, ya que resultan muy efectivos a la hora de obtener diferentes estructuras, desde cadenas en una única dimensión, redes bidimensionales y estructuras tridimensionales [Janiak, 2003]. Estos materiales han sido ampliamente estudiados en la bibliografía, generalmente con aplicaciones catalíticas, quirales, en luminiscencia, conductividad, etc. pudiéndose obtener también estructuras porosas [Tong *et al.*, 2002; Janiak, 2003]. Sin

5. ANTECEDENTES

embargo, los polímeros obtenidos empleando esta familia de ligandos se han aplicado escasamente en el área electroquímica.

En el desarrollo de sensores o biosensores electroquímicos, los polímeros de coordinación más empleados han sido los que presentan osmio como metal ya que este metal es capaz de actuar como mediador de la reacción redox enzimática y a la vez facilitar la transferencia electrónica hacia el electrodo [Ohara, 1995; Doherty y Vos, 1997]. A menor escala se han empleado también los polímeros basados en plata, donde cabe destacar que gracias a la actividad catalítica intrínseca de este metal hacia la reducción del peróxido de hidrógeno, se han desarrollado sensores para este analito sin necesidad de emplear enzimas [Luo *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2009].

5.3. Biosensores enzimáticos para compuestos de interés analítico

5.3.1. Biosensores para catecol

Los fenoles o compuestos fenólicos constituyen uno de los grandes grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante tanto de la dieta humana como animal. Estos compuestos se oxidan con mucha facilidad, lo cual les confiere propiedades antioxidantes beneficiosas para el organismo humano, pues contrarrestan la oxidación producida por radicales libres involucrados en el estrés oxidativo celular. Por otra parte, muchos compuestos fenólicos empleados en la industria y la agricultura son altamente tóxicos para el hombre, los animales y el medioambiente. En este grupo se encuentra el catecol (1,2-dihidroxibenceno), compuesto que tras exposición oral o subcutánea prolongada puede causar daños severos en diferentes órganos como el hígado, los pulmones, riñones y tracto urinario. Este compuesto es generalmente determinado mediante métodos espectrofotométricos, cromatográficos y electroforéticos. Sin embargo, la posibilidad de construir un dispositivo analítico para la rápida y precisa determinación de este difenol ha motivado el desarrollo de muchas investigaciones orientadas al diseño de dispositivos biosensores para este analito.

5. ANTECEDENTES

Los biorreceptores más comúnmente empleados en la construcción de biosensores electroquímicos para catecol son las enzimas lacasa, tirosinasa y peroxidasa. En nuestro trabajo de investigación nos hemos centrado en el uso de la lacasa y la tirosinasa como enzimas redox para el diseño de plataformas biosensoras para este analito.

5.3.1.1. Biosensores basados en la enzima lacasa

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas producidas principalmente por plantas, hongos, bacterias e insectos, que se caracterizan por una baja especificidad por su sustrato. Estas enzimas redox son capaces de oxidar compuestos fenólicos de diferente naturaleza, tales como metoxifenoles, fenoles, *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, moléculas de lignina y algunos iones inorgánicos. Las lacasas pertenecen al grupo de las oxidasas que presentan iones cobre (II) en su sitio activo. En la **Figura 5.15** se muestra la estructura tridimensional de esta enzima.

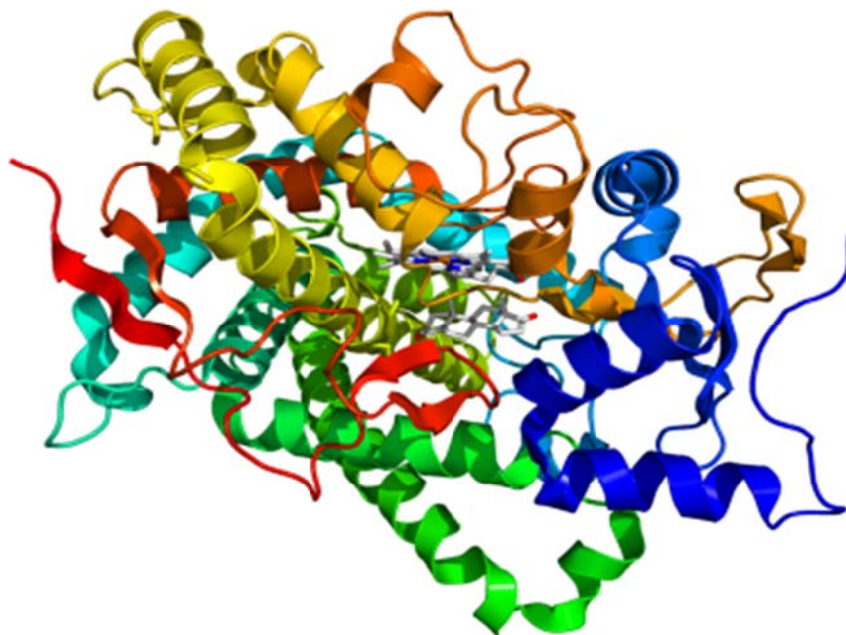


Figura 5.15. Estructura tridimensional de la lacasa de hongos.

5. ANTECEDENTES

En la **Tabla 5.2** se muestran las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos de lacasa para la determinación de catecol.

Tabla 5.2. *Parámetros analíticos de biosensores de lacasa para catecol.*

Electrodo	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad (mA/M)	LD (nM)	Referencia
Lac/FSM/GCE	2-100	-	2000	[Shimomura <i>et al.</i> , 2011]
Lac/NF/CNF/GCE	1-1310	41	630	[Li <i>et al.</i> , 2014]
Lac/MCNT/CS/GCE	0.1-165	-	33.4	[Pang <i>et al.</i> , 2011]
Lac/Cyst/Au	1-400	15	1000	[Gupta <i>et al.</i> , 2013]
Lac/CS/SiO ₂ -ZrO ₂ /GCE	1-100	8.8	350	[Qu <i>et al.</i> , 2014]
Lac/Cu-CNF/NF/GCE	9.95-1130	33.1	1180	[Fu <i>et al.</i> , 2014]
Lac/N-OMC/PVA/Au	0.39-8.98	290	310	[Guo <i>et al.</i> , 2014]
Lac/rGO-PdCuNC/GCE	5-1155	12.65	1500	[Mei <i>et al.</i> , 2015]
Lac/CS/ZnOsg/GCE	1-100	10.52	270	[Qu <i>et al.</i> , 2015]
Lac/PANI/GCE	3.2-19.6	706.7	2070	[Nazari <i>et al.</i> , 2015]
Lac/AuNP/PVA/MCNT-SPE	1-200	23	5000	[Favero <i>et al.</i> , 2015]
Lac/Au	1-400	15	1000	[Gupta <i>et al.</i> , 2003]
Lac/MCNT-CS/GCE	1.2-30	-	660	[Liu <i>et al.</i> , 2006]
Lac/Fe ₃ O ₄ -PANI/CS/CPE	0.5-80	-	400	[Sadeghi <i>et al.</i> , 2015]
Lac/Cys/Au	10-100	-	4760	[Akyilmaz <i>et al.</i> , 2014]
Lac/MCNT/GCE	20-1000	-	2000	[Qu <i>et al.</i> , 2013a]
Lac/NF/Au-CZF/GCE	0.17-7	1626	166	[Chen <i>et al.</i> , 2015]

LD: límite de detección; **Lac:** lacasa; **FSM:** polvo de sílice mesoporosa; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **NF:** Nafion; **CNF:** nanofibras de carbono; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **CS:** quitosano; **Cyst:** cisteamina; **SiO₂-ZrO₂:** nanopartículas de sílice modificadas con óxido de zirconio; **Cu-CNF:** nanofibras de Cu y C; **N-OMC:** carbón mesoporoso dopado con nitrógeno; **PVA:** alcohol polivinílico; **Au:** electrodo de oro; **PdCuNC:** nanocajas de Pd-Cu; **ZnOsg:** sol-gel de ZnO; **PANI:** polianilina; **AuNP:** nanopartículas de Au; **MCNT-SPE:** electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono de pared múltiple; **Fe₃O₄:** nanopartículas de Fe₃O₄; **CPE:** electrodo de pasta de carbón; **Cys:** cisteamina; **ZnO:** nanopartículas de óxido de zinc; **Au-CZF:** nanopartículas de oro modificadas con fibras de zeína.

5. ANTECEDENTES

Estas enzimas catalizan la oxidación de un substrato orgánico o inorgánico, con la consiguiente reducción de oxígeno molecular a agua (**Figura 5.16**).

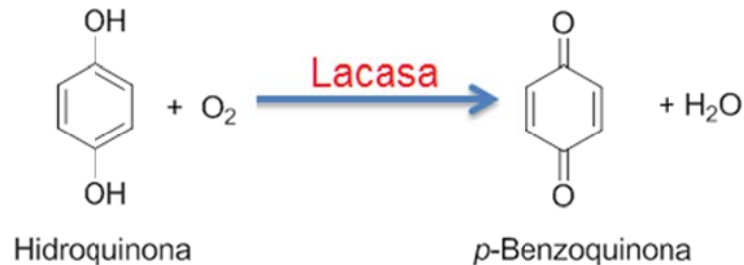


Figura 5.16. *Reacción de oxidación de fenoles catalizada por lacasas.*

Estas oxidasas se emplean en la industria textil, de cosméticos, alimentos, papel, y en el tratamiento de aguas residuales y la biorremediación de suelos. Desde un punto de vista analítico, estas enzimas son relevantes en la construcción de sistemas biosensores para la determinación de compuestos fenólicos.

5.3.1.2. Biosensores basados en la enzima tirosinasa

La tirosinasa (EC 1.14.18.1), también conocida como polifenoloxidasas, es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en bacterias, hongos, plantas y animales. La tirosinasa ha sido purificada a partir de una gran variedad de fuentes que incluyen desde el champiñón hasta el melanoma de ratón [Nelson y Dawson, 2006].

Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles, pero su especificidad es mayor frente a los monofenoles con una posición orto libre y los ortodifenoles. En este sentido, la tirosinasa de hongos empleada en nuestro trabajo presenta una alta especificidad por el catecol, por lo cual ha sido clasificada como una catecol oxidasa [Espín *et al.*, 2000]. En la **Figura 5.17** se muestra la estructura tridimensional de esta enzima.

5. ANTECEDENTES

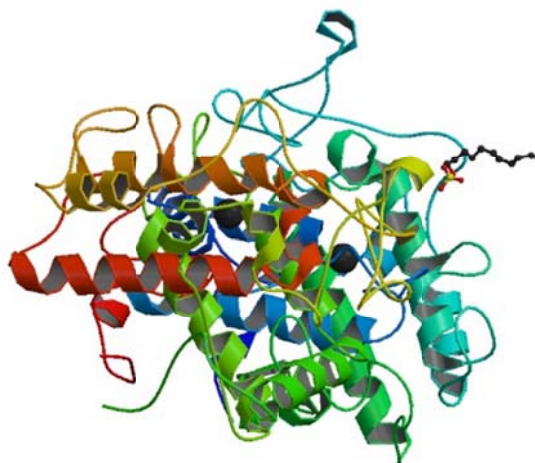


Figura 5.17. Estructura tridimensional de la tirosinasa de hongos.

En la **Figura 5.18** se presenta la reacción de transformación de catecol catalizada por la enzima tirosinasa.



Figura 5.18. Oxidación de catecol en presencia de tirosinasa.

La oxidación de este difenol en presencia de oxígeno y tirosinasa da lugar a una σ -quinona (benzoquinona) y agua [Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995]. Esta σ -quinona se reduce fácilmente sobre la superficie del electrodo, dando como producto el difenol de partida. Este proceso de “reciclaje” del sustrato permite la construcción de biosensores de tirosinasa altamente sensibles y con muy bajos límites de detección [Shan *et al.*, 2003]. Por tal motivo, esta enzima ha sido ampliamente empleada como biorreceptor catalítico para la construcción de biosensores orientados a la detección de catecol. En la **Tabla 5.3** se muestran las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos de tirosinasa para la determinación de este analito.

5. ANTECEDENTES

Tabla 5.3. Parámetros analíticos de biosensores de tirosinasa para catecol.

Electrodo	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad (mA/M)	LD (nM)	Referencia
Tir-AuNP/PBA-GO/SPE	0.083 - 23	160	24	[Song <i>et al.</i> , 2011]
Tir/OMC-AuNP/Lys/GCE	0.4 - 80	-	25	[Tang <i>et al.</i> , 2013]
Tir/GR- Co_3O_4 /CS/GCE	1 - 30	1857	30	[Liang <i>et al.</i> , 2016]
Tir/MCN/GCE	0.05 - 12.5	593	10.24	[Zhou <i>et al.</i> , 2014]
Tir/DHP/AuNP/GCE	2.5 - 95	115	170	[Vicentini <i>et al.</i> , 2016]
Tir/IL/MCNT/DHP/GCE	4.9-1100	32.8	580	[Vicentini <i>et al.</i> , 2013]
Tir-GR-SP/ GCE	0.001 - 17	-	0.23	[Qu <i>et al.</i> , 2013b]
Tir/TNT/GNPs/GCE	0.3 - 110	150	55	[Liu <i>et al.</i> , 2015]
Tir/GR-CS/GCE	1 - 400	69	750	[Yin <i>et al.</i> , 2011]
Tir/PAMAM- rGO/GCE	0.01 - 22	424	6	[Araque <i>et al.</i> , 2013]
Tir/rGO/SPE	2 - 16	89.8	100	[Baptista-Pires <i>et al.</i> , 2014]
Tir/CMC-rGO/GCE	2 - 56	270	20	[Araque <i>et al.</i> , 2014b]

LD: límite de detección; **Tir:** tirosinasa; **AuNP:** nanopartículas de Au; **PBA:** ácido 1-pirenobutanoico; **GO:** óxido de grafeno; **SPE:** electrodo serigrafado de carbono; **OMC:** carbón mesoporoso ordenado; **Lys:** filme de polilisina; **GR:** grafeno; **Co_3O_4 :** nanopartículas de Co_3O_4 ; **CS:** quitosano; **MCN:** nitruro de carbono mesoporoso; **DHP:** filme de dihexadecil fosfato; **IL:** líquido iónico de cloruro de 1-butil-3-metilimidazonio; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **SP:** péptido de la proteína de la seda; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **TNT:** nanotubos de TiO_2 ; **GNPs:** nanoplatos de grafeno; **PAMAM:** dendrímero de poliamidoamina G-4; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **CMC:** carboximetilcelulosa.

5.3.2. Biosensores para D-glucosa

La D-glucosa es un monosacárido con fórmula $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Esta hexosa es de gran importancia para la vida, ya que constituye el primer producto orgánico formado por las plantas a partir de CO_2 y H_2O mediante el proceso de fotosíntesis. La D-glucosa es una de las más importantes fuentes de energía para los organismos vivos, y se encuentra en la mayor parte de los alimentos. Asimismo, la alteración del metabolismo de la D-glucosa en humanos

5. ANTECEDENTES

ocasiona graves problemas de salud, fundamentalmente asociados a la diabetes mellitus y la obesidad [Heneka y Nicotera, 2016; Pendurthi y Karumanchi, 2017]. Por tal motivo, el desarrollo de sistemas analíticos para la detección de este azúcar ha centrado la atención de importantes investigaciones [Geddes y Lakowicz, 2006].

El primer biosensor electroquímico, desarrollado por Clark y Lyons en 1962, fue construido para la determinación de D-glucosa en sangre [Clark y Lyons, 1962]. Este biosensor, basado en la enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno, fue comercializado a partir de 1975 por Yellow Springs Instrument Company. A partir de este hito, el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para el análisis clínico de este analito continuó de forma acelerada. En la actualidad, los biosensores electroquímicos para D-glucosa representan más del 83% del mercado total de los biosensores, el cual alcanzó los 15.96 billones de dólares en 2016 [MarketsandMarkets, 2017]. Estos biosensores comerciales emplean como unidades de biorreconocimiento las enzimas glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa.

La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) es una oxidorreductasa que cataliza la oxidación de la D-glucosa en peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona [Wilson y Turner, 1992]. La principal fuente de obtención de esta enzima es el hongo *Aspergillus niger*. En la **Figura 5.19** se muestra la estructura tridimensional de esta enzima.



Figura 5.19. Estructura tridimensional de la glucosa oxidasa de *A. niger*.

5. ANTECEDENTES

En la **Tabla 5.4** se muestran las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos para D-glucosa basados en la enzima glucosa oxidasa.

Tabla 5.4. *Parámetros analíticos de biosensores enzimáticos para D-glucosa.*

Electrodo	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad ($\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$)	LD (μM)	Referencia
GOx/rGO-MCNT/GCE	10 - 6500	7.95	4.7	[Mani <i>et al.</i> , 2013]
GOx@p-MMA/Pt	9 - 8260	11.98	10	[Pérez <i>et al.</i> , 2016]
GOx/rGO-Fe ₃ O ₄ /MSPE	50 - 1000	-	0.1	[Pakapongpan y Poo-arporn, 2017]
GOx/SMSSE	5 - 1200	-	5	[Dudchenko <i>et al.</i> , 2016]
GOx/Fc-D/MCNT/CS/GCE	20 - 2910	-	7.5	[Zhou <i>et al.</i> , 2017]
GOx/AuNP/GF/ MCNT/GCE	5 - 175	29.72	4.8	[Yu <i>et al.</i> , 2014]
GOx/MCNT-SnS ₂ /NF/ GCE	20 - 1950	21.65	4.0	[Li <i>et al.</i> , 2013]
GOx-CS/NF/PtPd-MCNT/ GCE	62 - 14070	112	31	[Chen <i>et al.</i> , 2012a]
GOx-Ada/CD-PAMAM/PtNP/Au	5 - 705	197	2.0	[Díez <i>et al.</i> , 2013]
GOx/PtNPs/PAMAM-rGO/ GCE	10 - 8100	24.6	0.8	[Araque <i>et al.</i> , 2014a]
GOx/rGO/GCE	100 - 27000	1.85	100	[Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2013]
GOx-Fe ₃ O ₄ @Au/ SPCE (MnO ₂)	200 - 9000	2.52	100	[Samphao <i>et al.</i> , 2015]

LD: límite de detección; **GOx:** glucosa oxidasa; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **p-MMA:** nanopartículas de polimetilmetacrilato; **Pt:** electrodo de platino; **Fe₃O₄:** nanopartículas de Fe₃O₄; **MSPE:** electrodos serigrafados de carbono magnéticos; **SMSSE:** electrodo interdigitado de acero inoxidable modificado con silicalita; **Fc-D:** dendrímeros ramificados con ferroceno; **CS:** quitosano; **AuNP:** nanopartículas de Au; **GF:** grafeno; **SnS₂:** nanoláminas de SnS₂; **PtPd:** nanopartículas de Pt-Pd; **Ada:** adamantano; **CD:** β -ciclodextrina; **PAMAM:** dendrímeros o dendrones de poliamidoamina G-4; **PtNP:** nanopartículas de Pt; **Fe₃O₄@Au:** nanopartículas de Fe₃O₄ decoradas con nanopartículas de Au; **SPCE(MnO₂):** electrodos serigrafados de carbono modificados con MnO₂.

5. ANTECEDENTES

La enzima purificada de *Aspergillus niger*. es una proteína dimérica y glicosilada, que posee una molécula de flavín adenín dinucleótido por cada subunidad proteica. Este dinucleótido actúa como cofactor para la expresión de la actividad catalítica de la enzima. Esta enzima es ampliamente utilizada en biotecnología, en la transformación de alimentos y en ensayos bioquímicos. Sin embargo, su principal uso es en la determinación de la concentración de D-glucosa libre en los fluidos corporales y en los alimentos. En muchos de los sistemas biosensores desarrollados, esta enzima se combina con la peroxidasa en aras de reducir el valor de potencial empleado para la detección analítica.

5.3.3. Biosensores para peróxido de hidrógeno

La determinación de peróxido de hidrógeno es un tema de gran interés debido al importante papel que desempeña este compuesto en aplicaciones clínicas, industriales, alimentarias y medioambientales [Marinho *et al.*, 2014; Sies *et al.*, 2014; Barrington *et al.*, 2013; Regalado *et al.*, 2004]. Adicionalmente, este compuesto es subproducto de reacciones catalizadas por un gran número de enzimas del tipo oxidasa, por lo cual su determinación es la base de la fabricación de biosensores para la detección de muchos compuestos [Chen *et al.*, 2012b]. En general, los biosensores enzimáticos para H₂O₂ emplean la enzima peroxidasa como elemento de biorreconocimiento. En la **Figura 5.20** se muestra la estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano.

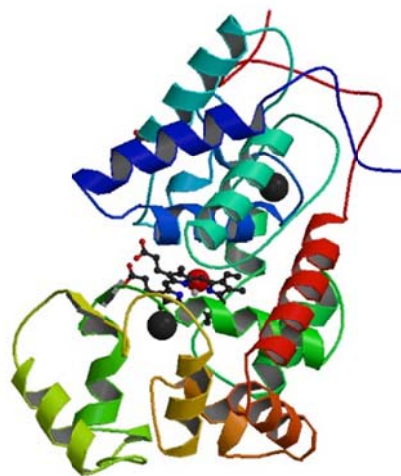


Figura 5.20. Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano (HRP).

5. ANTECEDENTES

La peroxidasa (EC 1.11.1.7) es una glicoenzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno [Shannon *et al.*, 1966]. La principal fuente de obtención de esta enzima es el rábano (*Armoracia rusticana*), aunque se encuentra distribuida en casi todos los organismos aeróbicos [Shannon *et al.*, 1966]. Esta enzima está glicosidada y contiene un grupo prostético hemo, que es el encargado de su acción catalítica [Gajhede *et al.*, 1997]. Además de ésta enzima existen otras hemoproteínas con actividad de tipo peroxidasa, como son la hemoglobina, la mioglobina y el citocromo [Grisham y Everse, 1991].

Tabla 5.5. Parámetros analíticos de biosensores de peroxidasa para H₂O₂.

Electrodo	Rango Lineal (mM)	Sensibilidad (A/M·cm ²)	LD (M)	Referencia
HRP/polyAuNP/Au	5·10 ⁻³ - 1.1	4.9·10 ⁻⁴	1.5·10 ⁻⁶	[Villalonga <i>et al.</i> , 2011]
NF/HRP/Bi ₂ WO ₆ /GCE	5·10 ⁻⁴ - 0.25	-	1.8·10 ⁻⁷	[Liu <i>et al.</i> , 2016]
HRP/PANI-PNMThH/Pt	5·10 ⁻⁴ - 2.5	3.5·10 ⁻⁴	3.2·10 ⁻⁶	[Chen <i>et al.</i> , 2016]
HRP/CS-MgO/Au	5·10 ⁻² - 3.5·10 ⁻¹	-	3.7·10 ⁻⁵	[Kale <i>et al.</i> , 2017]
HRP/AuNP/GCE	3·10 ⁻² - 8·10 ⁻¹	-	2·10 ⁻⁵	[Stasyuk <i>et al.</i> , 2016]
HRP/pcAu	1·10 ⁻⁴ - 4.0·10 ⁻²	1.4	1.0·10 ⁻⁸	[Ferapontova <i>et al.</i> , 2001]
HRP/C-Dots/LDHs/GCE	0.1 - 23	5.5·10 ⁻²	4.0·10 ⁻⁸	[Wang <i>et al.</i> , 2015]
HRP/ZnO-AuNP-NF/GCE	0.015 - 1.1	-	9·10 ⁻⁶	[Xiang <i>et al.</i> , 2009]
HRP/AuNP/GF/CS/GCE	5·10 ⁻³ - 5.13	-	1.7·10 ⁻⁶	[Zhou <i>et al.</i> , 2010]
HRP/CaCO ₃ -AuNP/Au	5·10 ⁻⁴ - 5.2	-	1·10 ⁻⁷	[Li <i>et al.</i> , 2010a]
HRP/AuNP-SF/GCE	0.01 - 1.8	-	5·10 ⁻⁶	[Yin <i>et al.</i> , 2009]
HRP-AuNP/ALG/Au	0.02 - 13.7	4.0·10 ⁻²	3·10 ⁻⁶	[Chico <i>et al.</i> , 2009]
HRP/AuNP/ITO	8·10 ⁻³ - 3.0	-	2·10 ⁻⁶	[Wang <i>et al.</i> , 2009]

LD: límite de detección; **HRP:** Peroxidasa de rábano; **polyAuNP:** nanopartículas de oro electropolimerizadas; **NF:** Nafión; **Bi₂WO₆:** microesferas de Bi₂WO₆; **AuNP:** nanopartículas de oro; **PANI-PNMThH:** polianilina-co-*N*-metiltionina; **Pt:** electrodo de Pt; **CS:** quitosano; **MgO:** nanopartículas de MgO; **Au:** electrodo de oro; **pcAu:** electrodo de oro policristalino; **C-Dots:** puntos cuánticos de carbono; **LDHs:** hidróxidos laminados de CoFe; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **GF:** grafeno; **SF:** fibroina de seda; **ALG:** alginato de sodio; **ITO:** electrodo de óxido de indio-estaño.

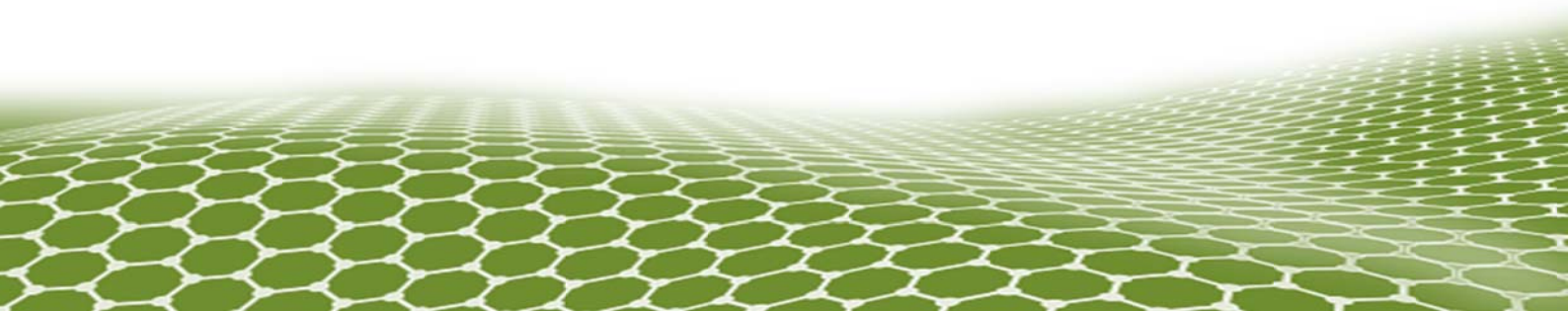
5. ANTECEDENTES

El número de publicaciones relacionadas con el empleo de esta enzima para la construcción de biosensores electroquímicos es elevado [Chen *et al.*, 2012b]. Sin embargo, uno de los mayores problemas que conlleva esta determinación es el alto potencial de oxidación que presenta el H₂O₂ cuando se utilizan superficies electródicas convencionales.

Con el fin de disminuir este potencial y favorecer el proceso de transferencia electrónica, se han utilizado distintos mediadores redox, aunque su empleo puede originar problemas relacionados con la toxicidad del propio mediador así como una baja sensibilidad y estabilidad del biosensor [Lindgren *et al.*, 2000]. Otra alternativa ha sido el uso de nanomateriales con efecto electrocatalítico sobre el H₂O₂ como elementos de transducción [Luo *et al.*, 2006]. En la **Tabla 5.5** se muestran, como ejemplo, las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos para H₂O₂ basados en la enzima peroxidasa.

6

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO



6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Uno de los principales retos de la Química Analítica en la actualidad es el establecimiento de nuevos métodos de análisis rápidos, sensibles y fiables, que no impliquen tratamiento de las muestras ni el uso de instrumentos complejos, y que puedan ser implementados fuera de los laboratorios. Esta problemática puede ser afrontada mediante el diseño de novedosas plataformas biosensoras amperométricas, donde se combine el uso de biorreceptores altamente específicos con la gran sensibilidad, simplicidad y capacidad de miniaturización presentada por los transductores electroquímicos.

Estos nuevos biosensores deberán ser altamente sensibles y reproducibles, específicos al analito de interés, de fácil manejo, capaces de proporcionar señales analíticas estables para concentraciones muy bajas de los analitos en muestras complejas, y todo ello sin sufrir el efecto adverso de interferencias.

Para poder construir estos nuevos sistemas biosensores, se necesita establecer estrategias novedosas y multidisciplinarias orientadas al desarrollo de nuevas superficies sensoras de carácter híbrido con óptima arquitectura e idóneas características estructurales y electroconductoras. Las interfaces así generadas deben ser capaces de favorecer la inmovilización estable de los biorreceptores de interés analítico y permitir la rápida transferencia electrónica. Una de las estrategias más acertadas para lograr este fin, basada en la ingeniería de nanomateriales, es el diseño racional de nuevos electrodos nanoestructurados con nanohíbridos de propiedades avanzadas.

En este sentido, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido el **diseño y construcción de originales plataformas biosensoras amperométricas basadas en el empleo de electrodos enzimáticos funcionalizados con nuevos nanomateriales híbridos**.

Con el fin de lograr dicho objeto general, se han planteado los siguientes **objetivos parciales**:

1. Preparación y caracterización de nuevos nanomateriales híbridos basados en derivados de óxido de grafeno, nanopartículas Janus y polímeros de coordinación.

6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. Preparación y caracterización de electrodos enzimáticos nanoestructurados con los nanomateriales híbridos.
3. Construcción y optimización de nuevos biosensores enzimáticos.
4. Evaluación de las propiedades analíticas y de estabilidad de las plataformas bioanalíticas preparadas, y de la aplicabilidad de algunas de ellas en el análisis de muestras reales.

El **plan de trabajo** propuesto para la consecución de los objetivos planteados se puede resumir en las siguientes etapas:

1. Diseño y preparación de los nanomateriales híbridos
2. Caracterización físico-química de los nanohíbridos preparados.
3. Preparación y caracterización de superficies electródicas nanoestructuradas y funcionalizadas con enzimas de interés analítico.
4. Optimización de las condiciones de preparación y uso de los biosensores enzimáticos nanoestructurados.
5. Determinación de las características analíticas, de estabilidad, selectividad y reproducibilidad de los biosensores, y su aplicación a la determinación de analitos en muestras reales.

En la **Figura 6.1** se representan las distintas plataformas (bio)electroanalíticas preparadas durante la realización de esta Tesis Doctoral.

6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

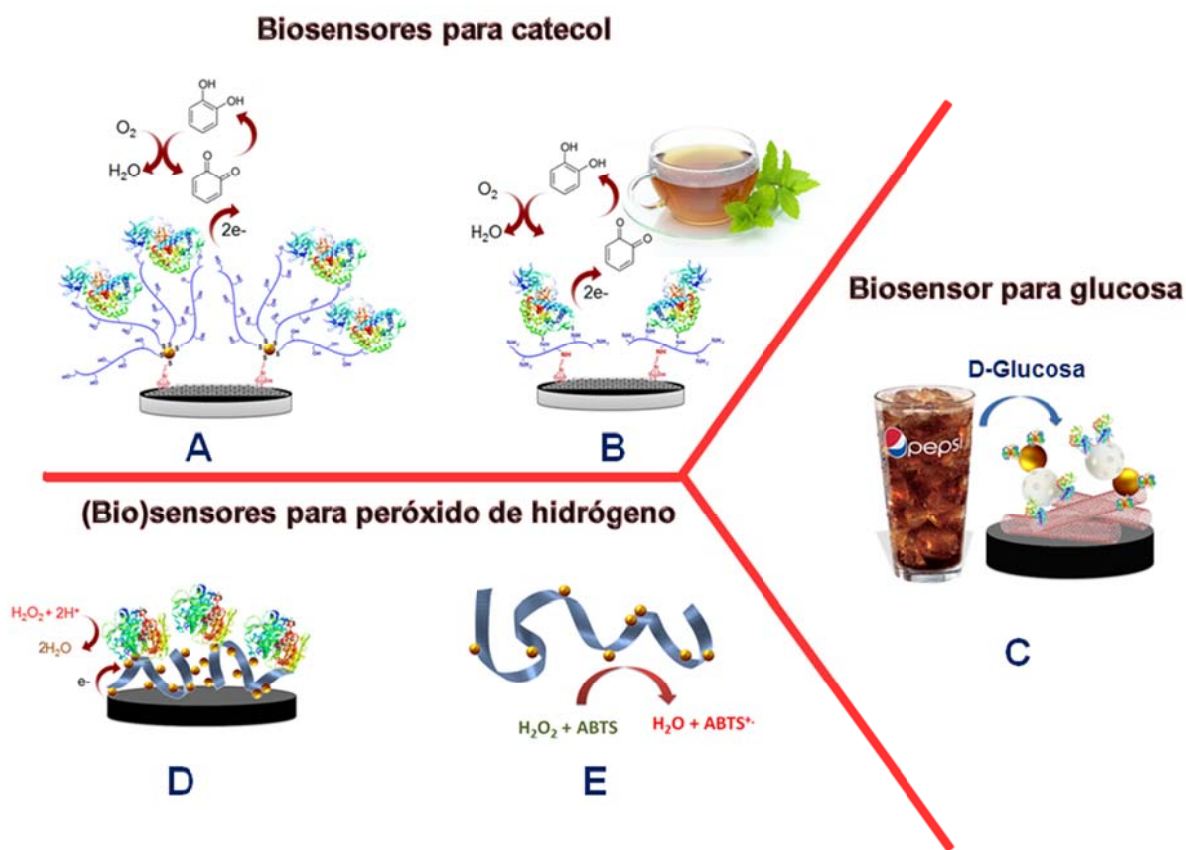
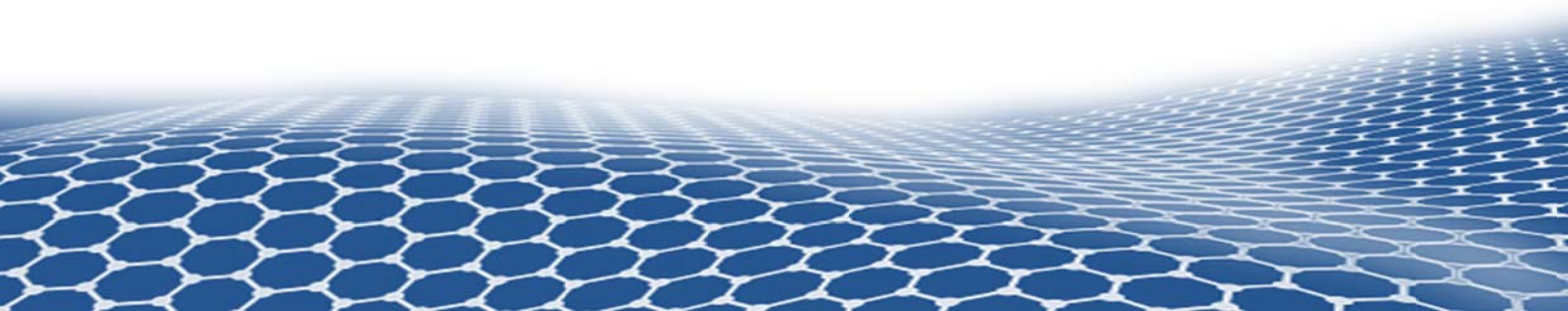


Figura 6.1. Representación esquemática de las plataformas electroanalíticas desarrolladas: (A) biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano, (B) biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano, (C) biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple, (D) biosensor enzimático y (E) sensor electroquímico para peróxido de hidrógeno basados en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro.

7

**PARTE
EXPERIMENTAL**



7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Instrumentación

7.1.1. Aparatos y técnicas de caracterización

La caracterización físico-química de los materiales preparados se realizó utilizando las siguientes técnicas:

- *Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)*, empleando los espectrómetros FT-IR Nicolet Nexus 670/870 (Thermo Fisher Scientific Inc.) y Alpha-T (Bruker). La muestra sólida se mezcló con KBr puro y seco en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino, a partir del cual se obtuvieron las pastillas empleando para ello una prensa hidráulica (10 TN, 5 mins).
- *Espectroscopia Raman*, empleando un espectrómetro Jobin Yvon HR460 (HORIBA Scientific Ltd). El análisis se realizó a temperatura ambiente, con 30 acumulaciones de espectros realizados en 80 s entre 1000 y 3500 cm^{-1} .
- *Análisis termogravimétrico (TG)*, empleando un instrumento modelo SDT-Q600 (TA Instruments), con un controlador de temperatura TASC 414/2 Netzsch. Los análisis se realizaron en un intervalo de temperatura entre 0 y 400°C bajo un flujo de N_2 de 100 mL/min y una velocidad de calentamiento de 10°C/min empleándose alúmina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) calcinada como material de referencia.
- *Difracción de rayos X (DRX)*, empleando un difractómetro X'Pert MPD (PANalytica.V), equipado con una fuente de Cu ($K_{\alpha 1}=1.54056 \text{ \AA}$ y $K_{\alpha 2}=1.54439 \text{ \AA}$).
- *Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)*, empleando un sistema de análisis de espectroscopia de fotoelectrones SPECS (SPECS Surface Nano Analysis GmbH), con sistema UHV con analizador de energía PHOIBOS 150 9MCD, y una fuente de rayos X de aluminio no monocromático a 12 kV.
- *Resonancia magnética nuclear (RMN)*, utilizando un espectrómetro Bruker DPX 300 MHz (Bruker). Los datos obtenidos del análisis estructural por ^1H -RMN se expresan en ppm para el desplazamiento químico (δ), con las abreviaturas s = singlete, d = doblete,

7. PARTE EXPERIMENTAL

t = triplete y m = múltiplete para la multiplicidad de la señal y con xH para el número de protones que se integran, siendo x igual a dicho número.

- Espectrometría Ultravioleta-visible (*UV/Vis*), utilizando un espectrofotómetro UV-vis Ultrospec™ 8000 Dual Beam (Biochrom).

La caracterización morfológica de los nanomateriales preparados se realizó mediante las técnicas siguientes:

- *Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)*, utilizando un microscopio JSM-6335F (JEOL Ltd.).
- *Microscopía de transmisión electrónica (TEM)*, empleando un microscopio JEM-2100 (JEOL Ltd.).
- *Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM)*, empleando un microscopio JEM-3000F (JEOL Ltd.).
- *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*, utilizando un microscopio AFM multimode Nanoscope III A (Bruker). La muestra suspendida en agua se depositó sobre una lámina de mica exfoliada mediante *spin-coating* a 1600 rpm.

Las técnicas electroquímicas empleadas durante la realización de este trabajo han sido:

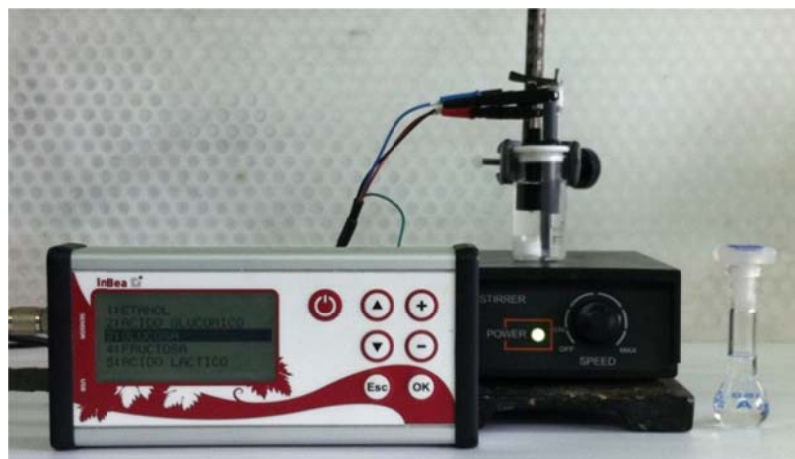


Figura 7.1. Potenciostato de Inbea Biosensores S.L. y agitador magnético Microstirrer (VELP).

7. PARTE EXPERIMENTAL

- *Medidas Amperométricas:* Se realizaron empleando un potenciostato Inbea (Inbea Biosensores S.L.) controlado por el software IbGraph 6.0 y un agitador magnético Microstirrer (VELP), para las medidas en disoluciones agitadas (**Figura 7.1**).
- *Espectroscopia de impedancia electroquímica:* Se efectuaron empleando un potenciostato μ Autolab tipo III controlado por el software FRA2 (Metrohm Autolab B.V.) (**Figura 7.2**).
- *Voltamperometría cíclica:* De utilizó un potenciostato μ Autolab tipo III controlado por el software GPES 4.9 (MetrohmAutolab B.V., Holanda).



Figura 7.2. Potenciostato μ Autolab tipo III empleado para realizar las medidas de CV y EIS.

Otros aparatos e instrumentos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Baño de ultrasonidos Elma.
- Balanza analítica Sartorius BP221s con una precisión de 0.0001 g.
- Centrifuga MPW-65R.
- pH-metro CRISON calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.01, 7.02 y 9.00.
- Agitador Vortex AGT-9 Bunsen.

7. PARTE EXPERIMENTAL

- Mufla ThermConcept KLE 09/11.
- Dispensor Ultra-Turrax T-18 (IKA).
- Liofilizador Telstar Cryodos-45.

7.1.2. Electrodo y celda de trabajo

Para realizar los estudios electroquímicos de los biosensores desarrollados en este trabajo se ha utilizado un sistema convencional de tres electrodos, consistente en:

- Electrodo de trabajo: Electrodo de disco de carbono vitrificado de 3.0 mm de diámetro (CHI Instruments), modificado con el material híbrido y la enzima inmovilizada.
- Electrodo de referencia: Ag/ AgCl/ KCl (3M) (CHI Instruments)
- Electrodo auxiliar: Hilo de platino.
- Célula electroquímica de vidrio de 10 mL.

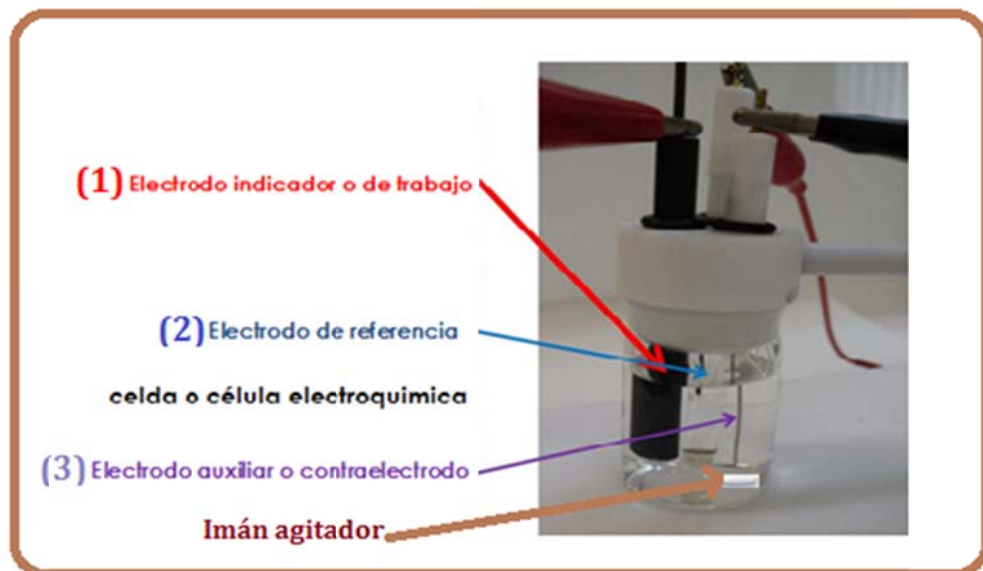


Figura 7.3. Sistema convencional de 3 electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) empleado en las medidas electroquímicas.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.2. Reactivos y materiales

Todos los reactivos y disolventes empleados son de calidad para análisis. El agua empleada en todos los casos ha sido obtenida mediante procesos de purificación en un sistema Millipore Milli-Ro.

A) Reactivos empleados en el pretratamiento de los electrodos:

- Polvo de alúmina de 3 μm (Tecmicro).
- Etanol 96% v/v (Panreac).
- Acetona 99% (Scharlau).

B) Reactivos empleados en la modificación del grafeno oxidado:

- Óxido de grafeno (GO, NanoInnova Technologies).
- (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilano ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich).
- (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano (95%, Sigma-Aldrich).
- Glicolquitosano, con grado de polimerización ≥ 400 ($\geq 60\%$, Sigma-Aldrich).

C) Reactivos y materiales empleados en la modificación del dextrano:

- Dextrano 4 (4000 Da, grado de polimerización = 22, Serva).
- Dihidrocloruro de cistamina ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich).
- Cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN , 95%, Sigma-Aldrich).
- Borohidruro de sodio (NaBH_4 , $>96\%$, Sigma-Aldrich).
- Tubo de diálisis Spectra/Por[®] con tamaño de poro de 1000 MWCO (Serva).

D) Reactivos utilizados en la preparación de las nanopartículas de oro (AuNPs):

- Ácido tetracloroaúrico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99%, Alfa Aesar).
- Citrato trisódico (98%, Sigma-Aldrich).

7. PARTE EXPERIMENTAL

E) Reactivos empleados en la preparación de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa (JNPs):

- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, 98%, Alfa Aesar).
- Hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Sigma-Aldrich).
- Tetraetoxisilano (TEOS, 98%, Sigma-Aldrich).
- (3-Aminopropil)triethoxisilano (APTES, 99%, Sigma-Aldrich).
- Cera de parafina, con punto de fusión 52-57 °C (Sigma-Aldrich).
- Metanol (99% v/v, Panreac).
- Cloroformo (99% v/v, Scharlab).

F) Reactivos empleados en la activación de los nanotubos de carbono de pared simple:

- Ácido nítrico (HNO₃, 65%, Scharlab).
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄, 95-97%, Scharlab).
- Nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT, Wako Pure Chemical Industries, Ltd).

G) Reactivos utilizados en la preparación de las nanocintas de polímeros de coordinación:

- 4-Mercaptopiridina (95%, Sigma-Aldrich).
- 6-Mercapto-1-hexanol (99%, Sigma-Aldrich).
- 4,4'-Bipiridina (98%, Sigma-Aldrich).
- Nitrato de plata (AgNO₃, 99%, Sigma-Aldrich).
- Dimetilsulfóxido (DMSO, 99.9%, VWR Internacional).
- Acetonitrilo (CH₃CN, Fisher Chemical).
- Éter dietílico (Scharlab).

H) Reactivos y materiales empleados en la preparación de los biosensores:

- Lacasa de *Trametes versicolor* (Lac, EC 1.10.3.2, 10 U/mg, Sigma-Aldrich).
- Tirosinasa de hongos (Tyr, EC 1.14.18.1, 5370 U/mg, Sigma-Aldrich).

7. PARTE EXPERIMENTAL

- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* Tipo VII (GOx, EC 1.1.3.4, 150 U/mg, Sigma-Aldrich).
- Peroxidasa de rábano tipo II (HRP, EC 1.11.1.7, 250 U/mg, Sigma-Aldrich).
- Glutaraldehído al 25% en agua (Sigma-Aldrich).
- 3,3'-Ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP, ThermoFisher).
- Microfiltros de centrífuga Amicon® Ultra de 10 kDa.

I) Reactivos utilizados en la preparación de las disoluciones de medida:

- Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Scharlau).
- Hidrogenofosfato de disodio anhidro (Na_2HPO_4 , Scharlau).
- Hexacianoferrato (III) de potasio trihidratado ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich).
- Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich).
- Cloruro potásico (KCl, Scharlau).

J) Analitos:

- Catecol (99%, Sigma-Aldrich).
- D-(+)-Glucosa anhidra (Panreac).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30% p/p, Sigma-Aldrich).

K) Reactivos empleados en la determinación colorimétrica de fenoles en muestras comerciales de infusiones:

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3 , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich).
- Reactivo Folin-Ciocalteu 2.0 N (Sigma-Aldrich).
- Té verde con limón, Té de frutos rojos y Té de menta marca Lipton.
- Catecol (99%, Sigma-Aldrich).

L) Reactivos empleados en la determinación de D-glucosa en muestras comerciales de refrescos:

- Refresco de Cola marca Pepsi.
- Refresco de naranja marca Kas.

7. PARTE EXPERIMENTAL

- Kit enzimático colorimétrico para D-glucosa (Sigma-Aldrich).
- D-(+)-Glucosa anhidra (Panreac).

M) Reactivos empleados en el ensayo de actividad catalítica tipo peroxidasa de los nanomateriales híbridos de oro con polímeros de coordinación piridina-plata:

- Sal de amonio del ácido 2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, 98% Sigma).
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30% (w/w), Sigma-Aldrich)

N) Reactivos empleados en los estudios de interferencias y selectividad de los biosensores:

- Hidroquinona (≥99%, Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (99%, Sigma-Aldrich)
- 4-*terc*-Butilfenol (99%, Sigma-Aldrich)
- 17β-Estradiol (97%, Sigma-Aldrich)
- 17α-Etinilestradiol (98%, Sigma-Aldrich)
- Nitrato de sodio (NaNO₃, 99%, Panreac).
- Ácido úrico (99%, Sigma).
- Ácido ascórbico (Gerbu).
- Ácido cítrico (98%, Sigma).
- Ácido láctico (Sigma).
- Ácido acético (99%, Scharlab).
- D-Fructosa (99%, Sigma).
- D-Galactosa (98%, Sigma-Aldrich).
- 3,4-Xilenol (98%, Aldrich)
- Fenol (99.5%, Sigma-Aldrich)
- 4-Cloro-1-naftol (Sigma)
- D-Sacarosa (Acros)
- L-Arabinosa (99%, Acros)

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.3. Disoluciones

- Disolución de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5mM, en KCl 0,1M: Se pesan 16 mg de $K_3Fe(CN)_6$, 21 mg de $K_4Fe(CN)_6$, 74 mg de KCl y se disuelven en 10 mL de agua Milli-Q.
- Disoluciones reguladoras de fosfato de sodio: Se preparan dos disoluciones madre de NaH_2PO_4 y de Na_2HPO_4 de concentración 0.2 M. A partir de ellas se preparan las disoluciones del pH deseado mediante mezcla de distintos volúmenes de cada una de ellas, y se ajusta la concentración mediante dilución con agua Milli-Q.
- Disolución de $HAuCl_4$ (0.01% p/p): Se pesan 5.8 mg de ácido tetracloroaúrico trihidratado y se disuelven en 50 mL de agua Milli-Q.
- Disolución de citrato trisódico (1% p/p): Se pesan 11.4 mg de citrato trisódico dihidratado y se disuelven en 1 mL de agua Milli-Q.
- Disolución patrón de catecol 0.01 M: Se disuelven 5.5 mg de catecol en 5 mL de disolución reguladora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de H_2O_2 0.1 M: Se disuelven 11 μ L de H_2O_2 al 30% (v/v) en 1 mL de disolución reguladora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución reguladora.
- Disolución patrón de D-(+)-glucosa 0.1 M: Se disuelven 180 mg de D-(+)-glucosa en 10 mL de disolución reguladora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Disoluciones de menor concentración se preparan por dilución con la misma disolución tampón.
- Disolución de $NaBH_4$: Se pesa 1 mg de $NaBH_4$ y se disuelve en 1 mL de agua Milli-Q.
- Disolución de 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil)propionato (DTSSP): Se disuelven 6mg de DTSSP en 2ml de disolución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.4. Metodología

7.4.1. Limpieza y preparación del electrodo de carbono vitrificado (GCE)

Antes de llevar a cabo la modificación de la superficie electródica es necesario aplicar un pretratamiento de limpieza para asegurar que se tiene una superficie completamente limpia y reproducible. Para ello, se pule el electrodo sobre una suspensión de polvo de alúmina de 0.3 μm durante 1 minuto. Seguidamente se lava el electrodo con agua Milli-Q y se sumerge en un baño de ultrasonidos con agua Milli-Q durante 1 minuto, y sucesivamente otro minuto con etanol, acetona y agua Milli-Q. Finalmente, se seca la superficie del electrodo en corriente de nitrógeno.

7.4.2. Preparación de un biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano

7.4.2.1. Preparación del nanomaterial híbrido de grafeno y glicolquitosano

La preparación del nanomaterial híbrido se realizó a partir de un proceso de síntesis en dos pasos. Inicialmente, se dispersaron 50 mg de óxido de grafeno en 250 mL de etanol en un matraz de fondo redondo con la ayuda de un baño de ultrasonidos durante 1 h. La dispersión resultante se calentó en un baño de silicona a 65°C y se añadió entonces 25 mL de una disolución de (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano al 1% (v/v) en etanol. La mezcla se mantuvo con agitación magnética constante a 65°C durante 12 h, y posteriormente se enfrió y se filtró. El sólido resultante de óxido de grafeno silanizado se lavó exhaustivamente con etanol y finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad en un desecador con P_2O_5 .

Para la preparación de nanohíbrido se pesaron 50 mg del derivado de grafeno previamente preparado, se transfirieron a un matraz de fondo redondo, y se dispersaron en 100 mL de agua Milli-Q con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Se adicionaron 100 mL de

7. PARTE EXPERIMENTAL

una disolución de glicolquitosano de concentración 1 mg/mL en agua Milli-Q, y la mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 12 h. El producto obtenido se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, seguidamente se lavó con agua y etanol, y finalmente se secó a vacío a temperatura ambiente.

7.4.2.2. Ensamblaje del electrodo enzimático con lacasa

Inicialmente se modificó la superficie limpia de un electrodo de carbono vitrificado con el derivado preparado anteriormente. Para ello se preparó una dispersión del nanomaterial híbrido de grafeno y glicolquitosano de concentración 0.5 mg/mL en agua Milli-Q, mediante tratamiento en baño de ultrasonidos. Se depositaron sobre la superficie del electrodo 12.5 μL de esta dispersión, y se dejó secar bajo lámpara incandescente. Este proceso se repitió con una segunda deposición de otros 12.5 μL de la dispersión.

Para la inmovilización de la enzima, se depositaron sobre la superficie del electrodo modificado 16 μL de una disolución de lacasa (10 mg/mL) en tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. Posteriormente, se adicionaron 2 μL de glutaraldehído al 25% (v/v) como agente de entrecruzamiento y se mantuvo el electrodo a 4°C durante una hora. El electrodo finalmente se lavó con disolución fría de tampón de fosfato de sodio 0.1 M (pH 5.5), y se conservó a 4°C en condiciones secas hasta su uso.

7.4.2.3. Preparación y análisis de muestras de infusiones

Para la determinación de fenoles en muestras reales de infusiones, inicialmente se prepararon cada una de las infusiones en un volumen final de 100 mL, empleando una bolsa de infusión comercial en cada caso. Para ello, se hirvieron unos 80 mL de agua Milli-Q durante unos 10 minutos, se introdujo la bolsa y se mantuvo durante 5 minutos.

7. PARTE EXPERIMENTAL

Posteriormente se retiró la bolsa, se dejó enfriar la disolución resultante y se enrasó con agua Milli-Q hasta 100 mL.

La determinación electroquímica de fenoles en estas muestras se llevó a cabo mediante el método de adiciones estándar. Para ello se efectuó una adición inicial de la muestra seguida de sucesivas adiciones de una disolución patrón de catecol de concentración conocida. Estas medidas se repitieron 3 veces con el fin de obtener unos resultados fiables.

Para determinar los fenoles totales en las muestras de infusiones se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu [Ainsworth y Gillespie, 2007]. Para realizar el calibrado se introdujeron en un matraz aforado de 10 mL, respetando el orden, 2 mL de agua Milli-Q, la cantidad necesaria de patrón de catecol, 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2.0 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20% (p/v). Las mezclas se enrasaron posteriormente a 10 mL con agua Milli-Q. Se agitó el matraz para homogenizar, se esperó 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. En el caso de las muestras se realizó de manera similar, únicamente cambiando el volumen de patrón de catecol por 200 μ L de la infusión a analizar.

7.4.3. Preparación de un biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano

7.4.3.1. Síntesis de dextrano funcionalizado con un grupo tiol terminal

Este derivado tiolado se preparó de acuerdo al siguiente protocolo [Pérez *et al.*, 2005; Villalonga *et al.*, 2005]. Para ello, se disolvieron 2 g de dextrano en 10 mL de agua Milli-Q, se añadieron 3.38 g de dihidrocloruro de cistamina y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se añadieron al medio de reacción 150 mg de NaBH_3CN y se mantuvo en agitación durante toda la noche. Posteriormente se adicionó NaBH_4 hasta una concentración final de 0.1 M y la mezcla se agitó durante una hora. La disolución resultante se

7. PARTE EXPERIMENTAL

dializó exhaustivamente frente a agua Milli-Q, con una membrana de diálisis de tamaño de poro de 1000 Da (Serva). Finalmente, la disolución se liofilizó y el producto resultante se almacenó en desecador hasta su uso. El dextrano tiolado sintetizado se caracterizó por RMN en D₂O.

¹H-RMN (D₂O, 300 MHz): δ 2.17 (t, CH₂-N, CH₂-S), δ 3.32-3.49 (m, H-2 y H-4), δ 3.59-3.67 (m, H-3 y H-5), δ 3.80-3.90 (m, H-6), δ 4.87 (d, H-1); ¹³C-RMN: (D₂O, 75 MHz): 73.6, 71.5, 70.4, 69.7, 65.5, 60.5, 30. 2.

IR (KBr): 3386, 2927, 1674, 1016 cm⁻¹

7.4.3.2. Preparación de la disolución de nanopartículas de Au coloidal

Estas nanopartículas se sintetizaron de acuerdo al método descrito por Frens [Frens, 1973]. En primer lugar se calentaron hasta ebullición 50 mL de una disolución de HAuCl₄ al 0.01% p/p. Una vez que la ebullición era constante se añadieron 0.75 mL de una disolución de citrato trisódico al 1% p/p. La mezcla se mantuvo en ebullición durante 15 minutos, y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, obteniéndose de esta forma una disolución estable de nanopartículas.

7.4.3.3. Preparación del nanomaterial híbrido de grafeno, oro y dextrano

La preparación del derivado híbrido se realizó a partir de un proceso de síntesis de tres pasos:

A) *Síntesis de grafeno tiolado*: De forma similar al apartado 7.4.2.1, inicialmente se dispersaron 50 mg de óxido de grafeno en 250 mL de etanol con la ayuda de un baño de ultrasonidos durante 1 h. La dispersión resultante se calentó en baño de silicona a 65°C y se mezcló con 25 mL de una disolución de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano al 1% (v/v) en

7. PARTE EXPERIMENTAL

etanol. La mezcla se mantuvo en agitación a 65°C durante 12 h, y posteriormente se enfrió y filtró. El sólido resultante de óxido de grafeno funcionalizado con grupos tioles se lavó exhaustivamente con etanol y finalmente se secó en desecador a vacío utilizando P₂O₅ como agente desecante.

B) Incorporación de nanopartículas de oro al derivado de grafeno: En un matraz de vidrio de fondo redondo se dispersaron 50 mg del derivado de grafeno tiolado en 40 mL de agua Milli-Q con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Posteriormente, se adicionaron 150 mg de NaBH₄ y se mantuvo la mezcla en agitación durante 1h. Posteriormente se adicionaron 20 mL de la disolución de nanopartículas de oro obtenida según el apartado **7.4.3.2**, manteniéndose la agitación durante otra hora. El derivado resultante de óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas de oro se purificó por filtración, se lavó de forma exhaustiva con agua Milli-Q, y finalmente se secó en desecador.

C) Obtención del material híbrido de grafeno-oro-dextrano: En un matraz de vidrio de fondo redondo se dispersaron 50 mg del nanohíbrido de grafeno preparado anteriormente, empleando 50 mL de agua Milli-Q y tratamiento en baño de ultrasonidos. Posteriormente se adicionaron 2 mL una disolución del derivado de dextrano tiolado en agua Milli-Q de concentración 250 mg/mL. La mezcla se mantuvo en agitación durante toda la noche. Posteriormente se filtró y el sólido resultante se lavó repetidamente con agua Milli-Q y etanol absoluto. Finalmente, el nanomaterial híbrido resultante de óxido de grafeno-oro-dextrano se secó con P₂O₅ al vacío en desecadora.

7.4.3.4. Ensamblaje del electrodo enzimático con tirosinas

Para la preparación del biosensor enzimático se depositaron, sobre la superficie limpia del electrodo de carbono vitrificado, 10 µL de una dispersión del nanomaterial híbrido de grafeno de concentración 0.5 mg/mL en agua Milli-Q, previamente preparada con ayuda de

7. PARTE EXPERIMENTAL

un baño de ultrasonidos. Esta dispersión se dejó secar bajo lámpara incandescente y se repitió el proceso con otros 10 μL de la dispersión.

Una vez cubierta la superficie del electrodo de trabajo con el nanomaterial híbrido, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima tirosinasa. Para ello, se depositaron sobre el electrodo modificado 20 μL de una disolución de la enzima 10 mg/mL en disolución de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. Seguidamente se añadieron 4 μL de glutaraldehído al 25% (v/v) sobre la superficie electródica, la cual se mantuvo durante 1 hora a 4°C. Pasado este tiempo se lavó el electrodo con disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, obteniéndose así el biosensor enzimático listo para su uso. Este biosensor se almacenó en condiciones secas a 4°C mientras que no se encontraba en uso.

7.4.4. Preparación de un biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple

7.4.4.1. Preparación de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa

A) *Preparación de nanopartículas de sílice mesoporosa:* Estas partículas se prepararon según la metodología descrita previamente en el grupo de investigación [Villalonga *et al.*, 2013; Díez *et al.*, 2014]. Para ello se disolvieron 0,5 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en 240 mL de agua Milli-Q. Una vez disueltos se añadieron 1.75 mL de una disolución de NaOH 2 M. La disolución se calentó hasta 80°C con agitación magnética y una vez alcanzada esa temperatura se añadieron 2.5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) gota a gota. La mezcla se mantuvo 2 horas a 80°C con agitación constante. El sólido blanco resultante se filtró, se lavó con agua Milli-Q y se secó en un desecador. Finalmente, el sólido se calcinó a 550°C durante 5 horas para eliminar el CTAB del interior de los poros.

7. PARTE EXPERIMENTAL

B) Preparación de las nanopartículas Janus: Estas nanopartículas se prepararon según el protocolo descrito previamente en el grupo de investigación [Villalonga *et al.*, 2013; Díez *et al.*, 2014]. Inicialmente, se dispersaron 200 mg de las nanopartículas de sílice mesoporosa, descrita en el apartado anterior, en 10 mL de una disolución 1.0 μM de CTAB en etanol acuoso (6.7% v/v) mediante la ayuda de un baño de ultrasonidos. La dispersión resultante se calentó en baño de silicona a 75°C y se añadió 1 g de cera de parafina. Una vez fundida la parafina, se agitó la mezcla a 25.000 rpm durante 10 min empleando un dispersor Ultra-Turrax T-18 (IKA).

La dispersión se mantuvo posteriormente bajo agitación magnética a 400 rpm durante 1h a 75°C. La emulsión de Pickering obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se añadieron 10 mL de metanol y 200 μL de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano. Esta reacción de funcionalización se mantuvo en agitación magnética durante 3h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo el material resultante se filtró y se lavó exhaustivamente con metanol.

Posteriormente se dispersó, con la ayuda de un baño de ultrasonidos, en 400 mL de la disolución de nanopartículas de oro preparadas de acuerdo con el método de Frens (ver apartado 7.4.3.2). Esta mezcla se dejó en agitación durante 16 h a temperatura ambiente, y el material resultante se filtró y se lavó exhaustivamente con agua Milli-Q. Para eliminar todos los restos de cera de parafina, el sólido se lavó tres veces con etanol y otras tres veces con cloroformo. Finalmente las nanopartículas Janus obtenidas se secaron en desecador a vacío con P_2O_5 , manteniéndose en el mismo hasta su utilización.

7.4.4.2. Inmovilización sitio-selectiva de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa en las nanopartículas Janus

A) Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa: Se dispersaron 100 mg de nanopartículas Janus en 100 mL de metanol con agitación magnética, y se añadieron 100 μL de (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTES) para funcionalizar la superficie de sílice de las nanopartículas con grupos amino primarios. La mezcla se agitó durante 3 h, se filtró

7. PARTE EXPERIMENTAL

posteriormente, y el sólido resultante se lavó con metanol, y se dejó secar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se dispersaron 3 mg de las nanopartículas Janus modificadas en 1 mL de disolución de fosfato de sodio 50 mM, pH 6, y se trataron con glutaraldehído (5% v/v, concentración final) durante 1 h con agitación en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las partículas se recuperaron mediante centrifugación y se lavaron tres veces con la misma disolución de fosfato de sodio para eliminar el exceso de glutaraldehído. Las nanopartículas se suspendieron en 2 mL de disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6, y se añadieron 6 mg de la enzima glucosa oxidasa. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética en baño de hielo durante 1 h. El nanomaterial resultante se recuperó mediante centrifugación y se lavó tres veces con disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6. Finalmente, las nanopartículas se dispersaron en 2 mL de disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.

B) Inmovilización de la enzima peroxidasa: La enzima peroxidasa se modificó inicialmente con grupos tioles para facilitar su inmovilización sobre la superficie de oro de las nanopartículas Janus. Para ello, se disolvieron 6 mg de peroxidasa y 6 mg de DTSSP en 2 mL de disolución de fosfato de sodio 50 mM, pH 6. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética durante 2 h a 4°C. Posteriormente se añadieron 20 µL de una disolución acuosa de NaBH₄ 0.1 M, manteniendo la agitación de la mezcla durante 30 min a 4°C. La disolución se dializó posteriormente con disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6, empleando cartuchos de diálisis de microcentrífuga Amicon Ultra de 10 kDa (Millipore).

La enzima modificada se diluyó en 1 mL de disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6, y se mezcló con los 2 mL de la dispersión de nanopartículas Janus modificadas con la enzima glucosa oxidasa, preparada anteriormente. La mezcla se mantuvo bajo agitación a 4°C durante 1 h. Las nanopartículas Janus bifuncionalizadas se recuperaron mediante centrifugación, y se lavaron 3 veces con la disolución fría de fosfato de sodio 50 mM, pH 6. Finalmente, las nanopartículas se suspendieron en 1 mL de la misma disolución y se mantuvieron a 4°C en refrigerador hasta su uso.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.4.4.3. Preparación del electrodo bienzimático

A) *Activación de los nanotubos de carbono:* Un gramo de nanotubos de carbono de pared simple se transfirieron a un matraz de vidrio de fondo redondo, y se dispersaron en 600 mL de una mezcla de HNO₃/H₂SO₄ concentrados (3:1, v/v). El matraz se colocó dentro de un baño de silicona conectado a condensador Allihn, y la mezcla se calentó hasta ebullición. La reacción de oxidación se mantuvo bajo reflujo y agitación durante 4 h.

Posteriormente, la mezcla se vertió con cuidado sobre 1.6 L de agua destilada, se filtró, y el sólido resultante se lavó exhaustivamente con agua Milli-Q hasta pH neutro. El sólido negro se calentó en estufa a 130°C durante toda la noche y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

B) *Modificación del electrodo con los nanotubos activados:* Para llevar a cabo el ensamblaje del biosensor bienzimático, se cubrió inicialmente la superficie pulida del electrodo de carbono vitrificado con 10 µL de una dispersión acuosa de nanotubos activados, de concentración 0.4 mg/mL, debidamente suspendida por tratamiento en baño de ultrasonidos. La superficie del electrodo se secó bajo lámpara incandescente.

C) *Modificación con las nanopartículas Janus bifuncionalizadas:* Se preparó inicialmente una suspensión de nanopartículas Janus bifuncionalizadas, de concentración 3 mg/mL, en disolución de fosfato de sodio 50 mM, pH 6. Se depositaron 20 µL de esta suspensión sobre la superficie del electrodo recubierta con nanotubos de carbono, y se dejó secar a 4°C. El electrodo modificado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

7.4.4.4. Preparación y análisis de muestras de bebidas comerciales

Para la determinación de D-glucosa en refrescos comerciales (Pepsi Cola y Kas Naranja), las muestras se desgasificaron inicialmente por tratamiento en baño de ultrasonidos. Posteriormente se diluyeron en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6, con el

7. PARTE EXPERIMENTAL

fin de obtener una concentración de D-glucosa dentro del intervalo lineal de respuesta del biosensor desarrollado.

La determinación electroquímica de D-glucosa en estas muestras se llevó a cabo mediante el método de adiciones estándar. Para ello se efectuó una adición inicial de la muestra seguida de sucesivas adiciones de una disolución patrón de D-glucosa de concentración conocida; estas medidas se repitieron 3 veces con el fin de obtener unos resultados fiables. Finalmente, estos resultados se compararon con los obtenidos mediante el empleo de un kit colorimétrico comercial, basado en un sistema enzimático acoplado de hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

7.4.5. Preparación de plataformas de detección electroquímica basadas en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro

7.4.5.1. Preparación del nanomaterial híbrido (Au-NBx)

A) Preparación de nanopartículas de oro bifuncionalizadas: La síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas con 6-mercapto-1-hexanol y 4-mercaptopiridina. se llevó a cabo de acuerdo al método descrito previamente por el grupo de investigación [Villalonga *et al.*, 2011; Villalonga *et al.*, 2012], que consiste en la adición gota a gota de una disolución de 50 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 12.7 mL de DMSO sobre una disolución agitada de 60 mg de NaBH_4 , 10 mg de 4-mercaptopiridina y 36.2 mg de 6-mercapto-1-hexanol en 12.7 mL de DMSO. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Las nanopartículas de oro bifuncionalizadas se precipitaron mediante la adición de 25 mL de CH_3CN , y se recogieron por centrifugación. Después se lavaron sucesivamente con 50 mL de una mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{DMSO}$ (1:1 v/v), con 50 mL de etanol y finalmente con 10 mL de éter dietílico. Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente.

B) Preparación del nanomaterial híbrido de coordinación: La síntesis de este nanohíbrido se realizó mediante una modificación del método descrito por el grupo de Luo para la

7. PARTE EXPERIMENTAL

preparación de polímeros de coordinación de plata-bipiridina [Luo *et al.*, 2011]. Sobre 2 mL de una disolución agitada de 4,4'-bipiridina (13 mg/mL en etanol), se adicionaron 200 μ L de una disolución acuosa de nanopartículas de oro bifuncionalizadas de concentración 10 mg/mL en agua Milli-Q (cantidades calculadas para la preparación de nanohíbrido Au-NB200). La muestra se mantuvo bajo agitación vigorosa, y se añadió 1 mL de AgNO_3 34 mg/mL en agua Milli-Q, observándose rápidamente la aparición de un precipitado. Después de mantener en agitación durante 10 min, el sólido se separó mediante centrifugación, se lavó dos veces con etanol y por último se dispersó en 3.2 mL de etanol.

Para la preparación de nanohíbridos con diferente contenido de nanopartículas de oro, se empleó el mismo procedimiento pero empleando diferentes volúmenes de disolución de nanopartículas (Au-NB0 = 0 μ L , Au-NB50 = 50 μ L, Au-NB100 = 100 μ L, Au-NB150 = 150 μ L y Au-NB300 = 300 μ L).

7.4.5.2. Estudio de actividad catalítica tipo peroxidasa de los nanohíbridos

Los nanohíbridos preparados se evaluaron como posibles enzimas artificiales tipo peroxidasa empleando un método colorimétrico. La actividad catalítica frente al H_2O_2 de los nanohíbridos de coordinación preparados con diferente contenido de nanopartículas de oro se determinó por el método colorimétrico con ABTS descrito por Jiang y Penner para la enzima peroxidasa [Jiang y Penner, 2015].

7.4.5.3. Ensamblaje de un electrodo enzimático de peroxidasa para H_2O_2

Se modificó la superficie limpia del electrodo de carbono vitrificado con el nanohíbrido Au-NB200 mediante el depósito de 20 μ L de la dispersión etanólica de este nanomaterial, y se secó bajo lámpara incandescente. Seguidamente se depositaron sobre el electrodo nanoestructurado 12 μ L de una disolución de peroxidasa 10 mg/mL en disolución de fosfato

7. PARTE EXPERIMENTAL

de sodio 0.1 M, pH 6, y 2 μL de glutaraldehído al 25% (v/v). El electrodo se mantuvo a 4°C durante 1 h, después se lavó varias veces con disolución fría de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6, se dejó secar y finalmente se almacenó en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

7.4.5.4. Preparación de un sensor nanoestructurado con Au-NB200 para H_2O_2

Se modificó la superficie limpia del electrodo de carbono vitrificado con el nanohíbrido Au-NB200 mediante el depósito de 20 μL de la dispersión etanólica de este nanomaterial, y se secó bajo lámpara incandescente. El electrodo modificado se lavó varias veces con agua milliQ, se dejó secar y finalmente se almacenó en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

7.4.5.5. Preparación de un biosensor enzimático nanoestructurado con Au-NB200 para D-glucosa

Sobre la superficie del electrodo preparado en el apartado 7.4.5.4 se depositaron consecutivamente 10 μL de una disolución de la enzima glucosa oxidasa, de concentración 10 mg/mL en disolución de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7, y 2 μL de glutaraldehído al 25% (v/v). El electrodo se mantuvo a 4°C durante 1 h, después se lavó varias veces con disolución fría de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7, se dejó secar y finalmente se almacenó en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

7.5. Técnicas electroquímicas de análisis y caracterización

7.5.1. Espectroscopia de impedancia electroquímica

Las medidas de impedancia electroquímica se realizaron con el sistema de electrodos descrito en el apartado 7.1.2, con un volumen de 10 mL de una disolución 5 mM de

7. PARTE EXPERIMENTAL

$K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (1:1) en KCl 0.1 M. Estas medidas se realizaron al potencial de equilibrio, correspondiente a paso de corriente cero, del par $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$, con una amplitud de excitación sinusoidal $V_{rms} = 10$ mV. Las medidas se llevaron a cabo cinco veces a cada frecuencia y se promediaron durante el barrido. La impedancia se midió en el intervalo apropiado de frecuencias a 20 pasos por década.

7.5.2. Voltamperometría cíclica

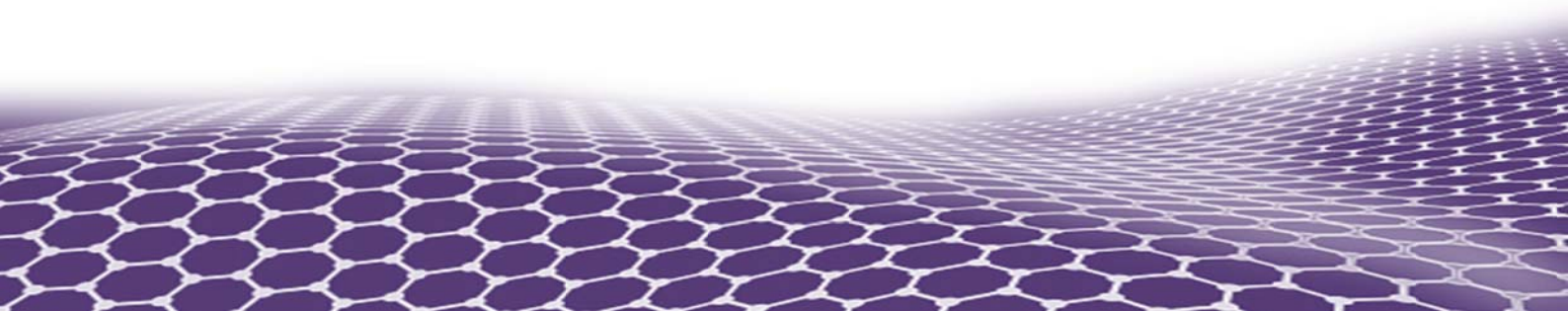
Las curvas de intensidad-potencial realizadas para comprobar el comportamiento de las plataformas (bio)sensoras frente a sus sustratos correspondientes se obtuvieron sumergiendo los electrodos en la disolución reguladora correspondiente y midiendo la respuesta voltamperométrica a una velocidad de barrido de 50 mV/s. Posteriormente se midió la respuesta voltamperométrica del electrodo en la misma disolución reguladora en presencia de una determinada concentración del analito.

7.5.3. Amperometría en disoluciones agitadas

Los amperogramas en disoluciones agitadas se obtienen sumergiendo los electrodos (de trabajo, de referencia y auxiliar) en la célula de medida que contiene 10 mL de la disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, de pH adecuado para cada aplicación concreta, agitándose mecánicamente de forma constante. Se aplica el potencial deseado y se espera hasta alcanzar la estabilización de la corriente de fondo. A continuación se añade el volumen adecuado de la disolución patrón del compuesto a analizar, y se registra la corriente hasta que se alcanza el estado estacionario. Entre una medida y otra no es necesario aplicar ningún tratamiento al (bio)sensor. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se efectúan adiciones sucesivas de la disolución patrón correspondiente, hasta no obtener variación apreciable en la intensidad de corriente en el estado estacionario, lo que confirma la saturación del biosensor.

8

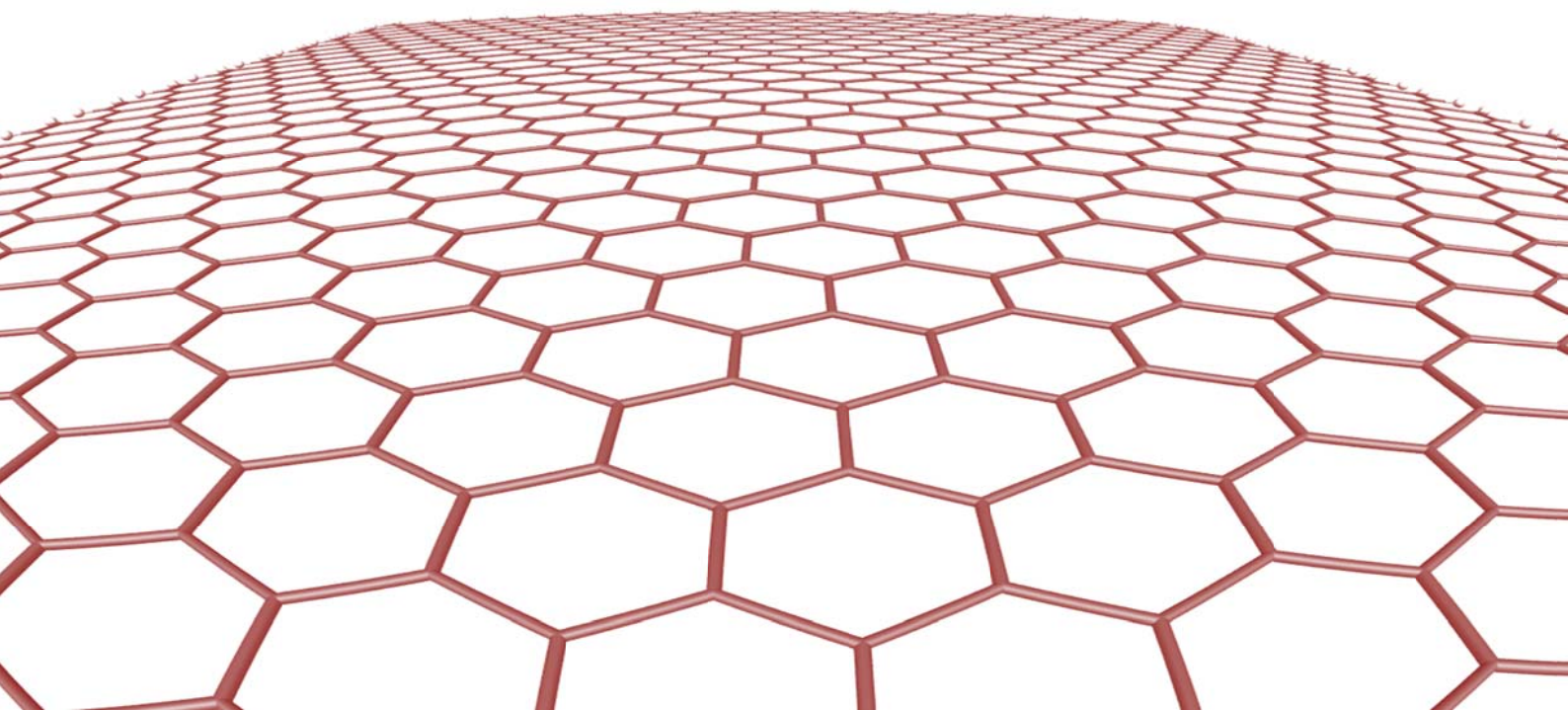
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Parte I: Biosensores basado en nanohíbridos de óxido de grafeno

8.1

Biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano



8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Biosensor amperométrico para fenoles basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.

8.1.1. Preparación del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la preparación de un derivado híbrido del óxido de grafeno capaz de formar dispersiones estables en disoluciones acuosas. Para ello se propuso la modificación inicial del óxido de grafeno con un derivado de silano, el cual reacciona selectivamente con los grupos hidroxilos situados sobre las caras del nanomaterial, creando sitios reactivos para la posterior unión del polisacárido (**Figura 8.1**). Mediante esta estrategia se asegura la introducción de una alta densidad de grupos amino primarios procedentes del polímero, sin afectar significativamente a la estructura carbonácea del nanomaterial.

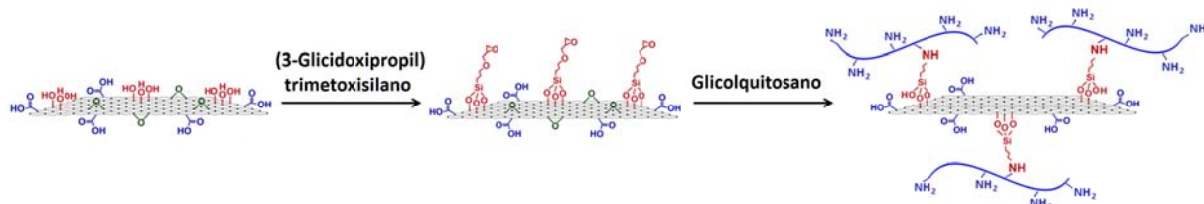


Figura 8.1. Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.

Para preparar este nanohíbrido se procedió inicialmente a la modificación del óxido de grafeno con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano, introduciendo de esta forma grupos epoxi reactivos sobre la superficie del nanomaterial. Estos grupos fueron posteriormente empleados como sitios de anclaje de las moléculas de glicolquitosano a través de los grupos amino primarios presentes en dicho polisacárido, los cuales fueron transformados en grupos amino secundarios mediante reacciones de sustitución nucleofílica (**Figura 8.2**).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

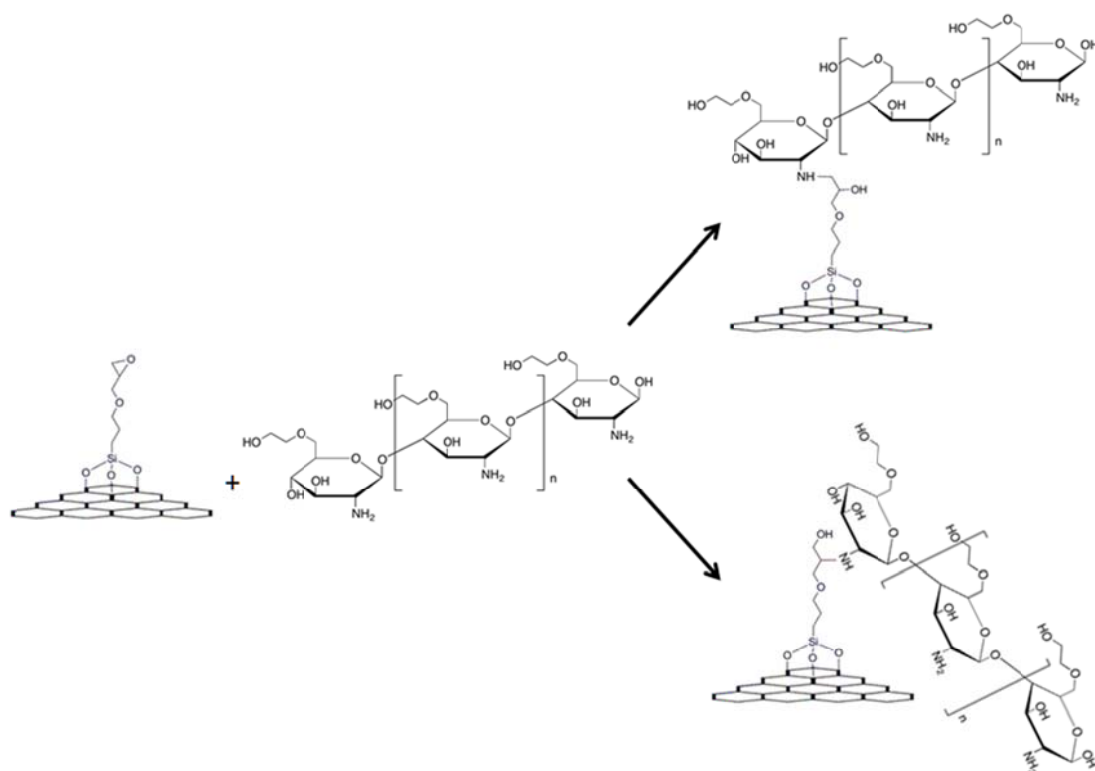


Figura 8.2. Representación esquemática de las reacciones de formación de los enlaces amino secundarios en el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.

El material preparado mediante este procedimiento presentó la ventaja de ser fácilmente dispersable en medio acuoso, gracias a las propiedades de solubilidad conferidas por el polisacárido glicolquitosano. Por otra parte, el material presentó el color negro intenso característico del carbono, a diferencia del color marrón presentado por el óxido de grafeno inicial. Este hecho nos hizo suponer la posible reducción del nanomaterial inicial, propiciado por la presencia de grupos amino primarios en el medio de reacción. Este tipo de reducción parcial del óxido de grafeno ha sido previamente descrito para derivados preparados con dendrímeros de poliamidoamina [Araque *et al.*, 2013].

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.2. Caracterización del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y glicolquitosano.

El nanomaterial híbrido fue caracterizado empleando diferentes técnicas, tales como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, termogravimetría, espectroscopia Raman, microscopia electrónica de barrido con emisión de campo y microscopía electrónica de transmisión.

8.1.2.1. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia FT-IR.

En la **Figura 8.3** se muestran los espectros FT-IR del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y glicolquitosano (c).

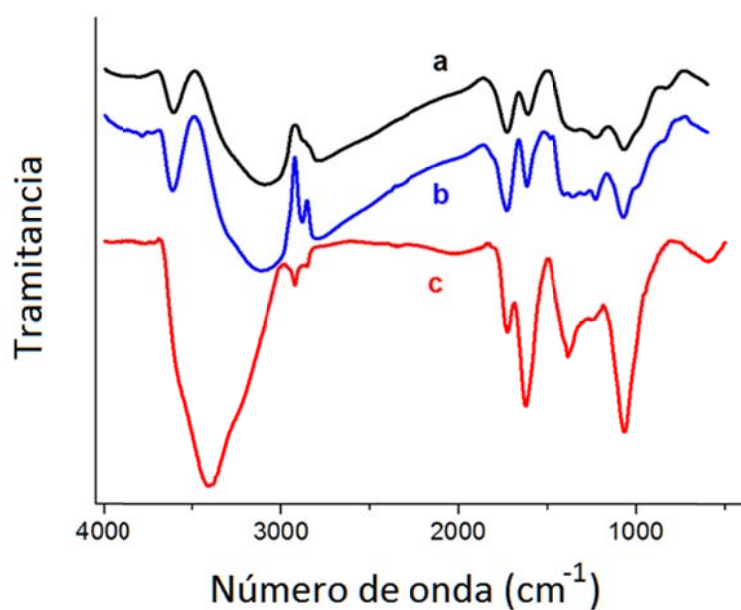


Figura 8.3. Espectros FT-IR del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El óxido de grafeno presentó dos bandas prominentes a 3607 cm^{-1} y 3090 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones fundamentales de los enlaces O-H libres y enlazados mediante puentes de hidrógeno intermoleculares, respectivamente. En este espectro se pueden observar bandas a 1353 cm^{-1} y 1230 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de enlace de los grupos C-OH y C-O-C. Por otra parte, las bandas observadas a 1730 cm^{-1} y 1065 cm^{-1} pueden ser asociadas a la vibración de los grupos C=O y C-O, respectivamente. Asimismo, la banda observada a 1608 cm^{-1} puede ser producida por las vibraciones de los dominios del esqueleto grafítico no oxidado, así como por las moléculas de agua adsorbida [Mermoux *et al.*, 1991].

La modificación del óxido de grafeno con el derivado de silano puede ser confirmada a partir de su espectro de FT-IR mediante la presencia de las bandas a 2880 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} , las cuales pueden ser atribuidas a la vibración y flexión de los enlaces de los grupos metileno de las moléculas de (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano, respectivamente. Adicionalmente, la banda que aparece a 986 cm^{-1} puede asociarse con la vibración fundamental de los grupos Si-O.

El espectro del nanohíbrido de óxido de grafeno-glicolquitosano mostró un perfil muy diferente, caracterizado por la presencia de las bandas propias del polisacárido. En este sentido, son fácilmente identificables las bandas correspondientes a la vibración de los grupos O-H y N-H libres a 3400 cm^{-1} , la vibración de los grupos C-H a 2915 cm^{-1} , así como las bandas Amida I y II a 1726 cm^{-1} y 1623 cm^{-1} , respectivamente. La presencia de este polisacárido en el nanomaterial híbrido fue asimismo confirmada por la banda intensa centrada a 1062 cm^{-1} , característica de la vibración de los grupos C-O-C en los anillos de N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.2.2. Caracterización del nanohíbrido por termogravimetría.

Los derivados de óxido de grafeno preparados en este trabajo fueron caracterizados mediante termogravimetría, y los resultados de estos análisis se muestran en la **Figura 8.4**.

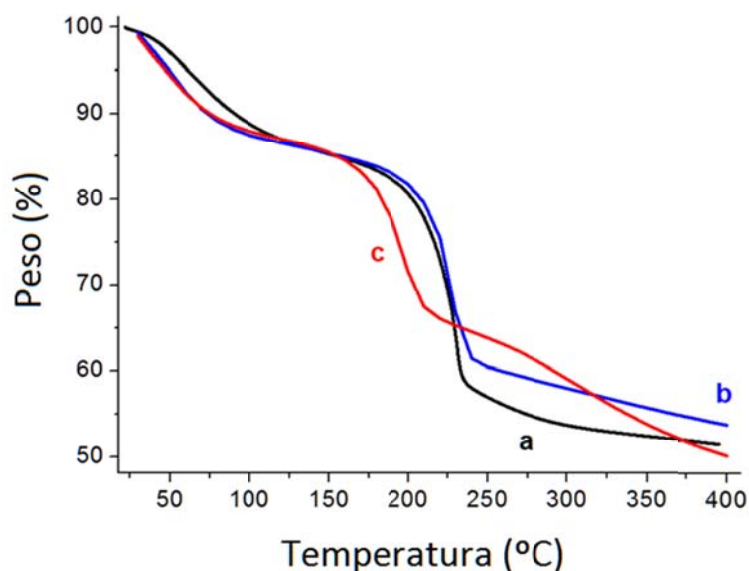


Figura 8.4. Análisis termogravimétrico del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).

En los tres nanomateriales bajo estudio se observa una pérdida de masa en el rango de temperaturas entre 25°C -150°C, lo cual puede ser atribuido a la pérdida de las moléculas de agua adsorbidas sobre el nanomaterial. El óxido de grafeno presentó una única etapa de descomposición térmica a 200°C-250°C, con la consiguiente pérdida del 31.2% de peso, lo cual puede ser asociado a la degradación de los grupos funcionales del oxígeno localizados sobre el plano basal y los bordes del nanomaterial.

La modificación del óxido de grafeno con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano incrementó ligeramente la estabilidad térmica del nanomaterial, presentando un aumento para la temperatura de máxima velocidad de descomposición térmica de 230°C a 232°C. El derivado

8. RESULTADOS Y DISCUSION

silanizado del óxido de grafeno presentó además una menor pérdida de peso durante dicho proceso de descomposición térmica.

Por otra parte, y como era de esperar, la modificación con el polisacárido glicolquitosano produjo una drástica reducción en la estabilidad térmica del nanomaterial, reduciendo la temperatura de máxima velocidad para el primer proceso de descomposición térmica de 232°C a 195°C. Este derivado presentó una segunda etapa de descomposición térmica, con máxima velocidad de descomposición a 302°C, la cual pudiera estar asociada a procesos de descomposición/deshidratación del polímero. Debe destacarse que el nanohíbrido presentó un aumento del 7% en la pérdida de peso total bajo estas transformaciones térmicas, en comparación con el derivado silanizado. Esta diferencia en pérdida de peso se mantuvo constante hasta los 1000°C (datos no mostrados), lo cual permitió estimar un contenido de polisacárido del 17.4% en peso, expresado como D-glucosamina, en el nanohíbrido de grafeno.

8.1.2.3. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia Raman.

En la **Figura 8.5** se muestran los espectros Raman del óxido de grafeno y sus derivados. El espectro del óxido de grafeno de partida mostró las características bandas anchas G y D a 1584 cm^{-1} y 1344 cm^{-1} , las cuales respectivamente caracterizan la vibración en fase de los retículos de grafito y los desórdenes estructurales en sus bordes [Berciaud *et al.*, 2008]. Estas bandas solo sufrieron un ligero desplazamiento a 1580 y 1348 cm^{-1} tras la modificación del nanomaterial con el derivado de silano, manteniéndose la relación de intensidades D/G igual a 0.96. Sin embargo, el aumento observado para la intensidad de la banda 2D, que aparece a 2682 cm^{-1} en el caso del óxido de grafeno, y a 2644 cm^{-1} en el del derivado silanizado, sugiere la formación de agregados entre láminas de nanomaterial modificado, lo cual pudiera atribuirse al entrecruzamiento interlaminar que se da mediante reacción de los grupos epóxido en una lámina y los grupos hidroxilo remanentes en otra.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

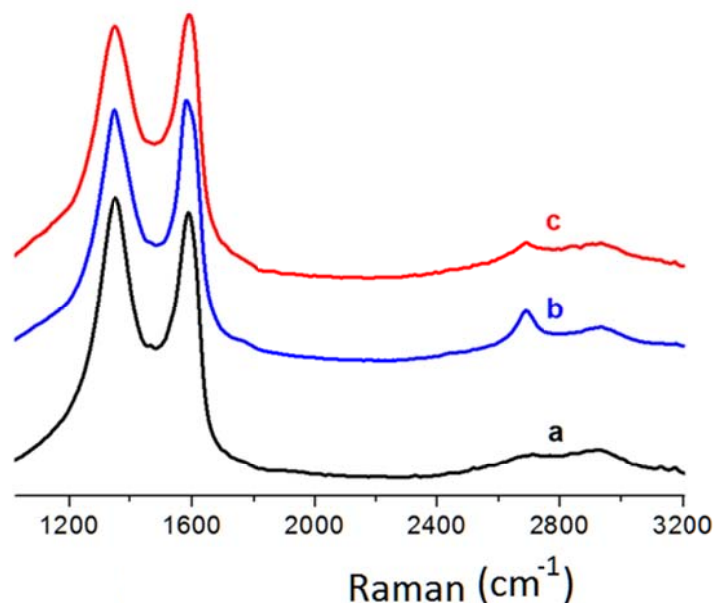


Figura 8.5. Espectros Raman del óxido de grafeno (a), óxido de grafeno modificado con (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (b) y nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (c).

La modificación de este nanomaterial con el polisacárido glicolquitosano produjo un ligero desplazamiento de las bandas G y D a 1589 y 1349 cm^{-1} respectivamente, con un valor de 0.97 para la relación de intensidades D/G. Este patrón espectral sugiere un alto grado de interacción química entre las moléculas del polisacárido y las láminas del nanomaterial. Por otra parte, la disminución de la intensidad de la banda 2D sugiere que la modificación covalente con el polímero evita la formación de agregados entre láminas del óxido de grafeno modificado, probablemente a través de procesos de repulsión electrostática e impedimento estérico.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.2.4. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo.

El nanohíbrido preparado fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo, en aras de determinar los cambios morfológicos inducidos en el óxido de grafeno tras su modificación covalente con el polisacárido.

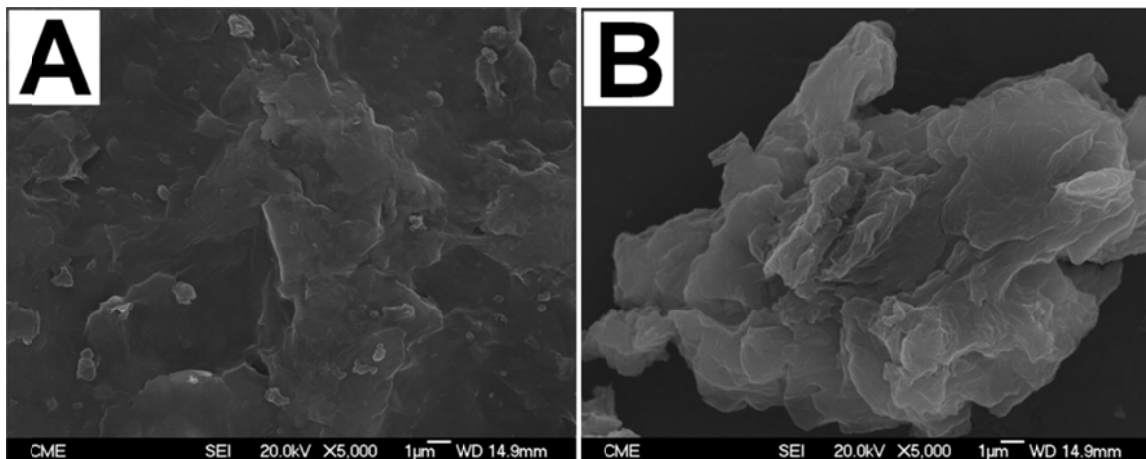


Figura 8.6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo del óxido de grafeno (A) y el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (B).

Como se muestra en la **Figura 8.6**, el nanomaterial de partida mostró una morfología de capas totalmente extendidas, característica del óxido de grafeno. Por el contrario, el nanohíbrido presentó una morfología de láminas plegadas en estructuras corrugadas, las cuales forman nanoestructuras tridimensionales voluminosas. Este aspecto, similar al mostrado por otros derivados de óxido de grafeno modificado con polímeros iónicos [Araque *et al.*, 2013; Borisova *et al.*, 2015], sugiere la formación de entrecruzamientos interlaminares en el nanohíbrido, probablemente causado por la unión multipuntual covalente y/o iónica de cadenas del polisacárido con las láminas del óxido de grafeno.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.2.5. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de transmisión.

En la **Figura 8.7** se muestran imágenes características del óxido de grafeno utilizado como material de partida, así como del nanohíbrido preparado por modificación covalente con el polisacárido aminado.

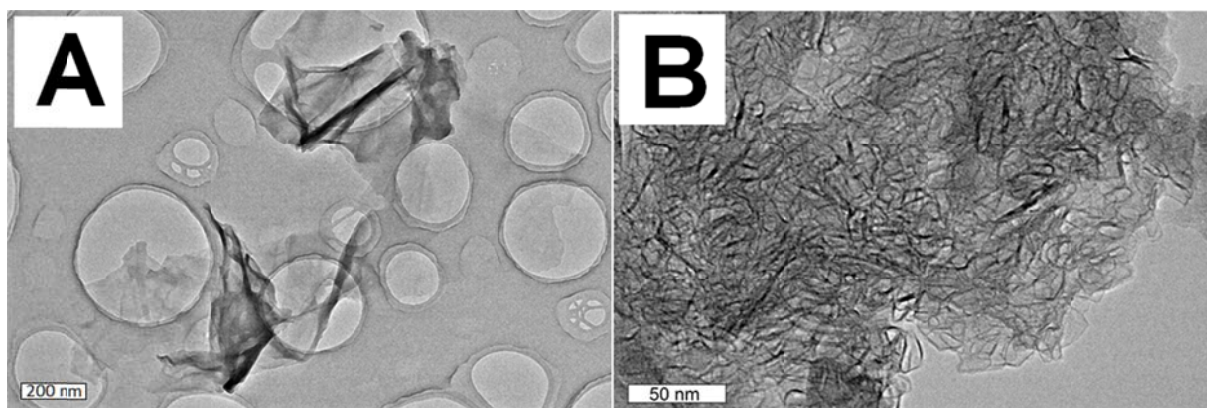


Figura 8.7. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del óxido de grafeno (A) y el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (B).

A diferencia del óxido de grafeno, el cual muestra una estructura laminar extendida, el nanohíbrido preparado muestra una estructura de capas corrugadas y superpuestas, confirmando los resultados antes obtenido mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo.

8.1.3. Ensamblaje del electrodo enzimático de lacasa.

El nanomaterial híbrido preparado fue empleado como material de recubrimiento de electrodos de carbono vítreo, sobre los cuales se inmovilizó la enzima lacasa mediante entrecruzamiento con glutaraldehído, con el objetivo de construir un biosensor enzimático para compuestos fenólicos. Mediante esta estrategia de inmovilización, basada en el uso de un dialdehído alifático, se facilita el entrecruzamiento covalente y estable de los grupos ϵ -

8. RESULTADOS Y DISCUSION

amino primarios en los residuos de lisina de la enzima con los grupos amino primarios de las unidades de D-glucosamina en el polisacárido. Asimismo, este dialdehído tiene la capacidad de formar enlaces hemiacetales estables con los grupos hidroxilo de los residuos de aminoácidos y el polímero.

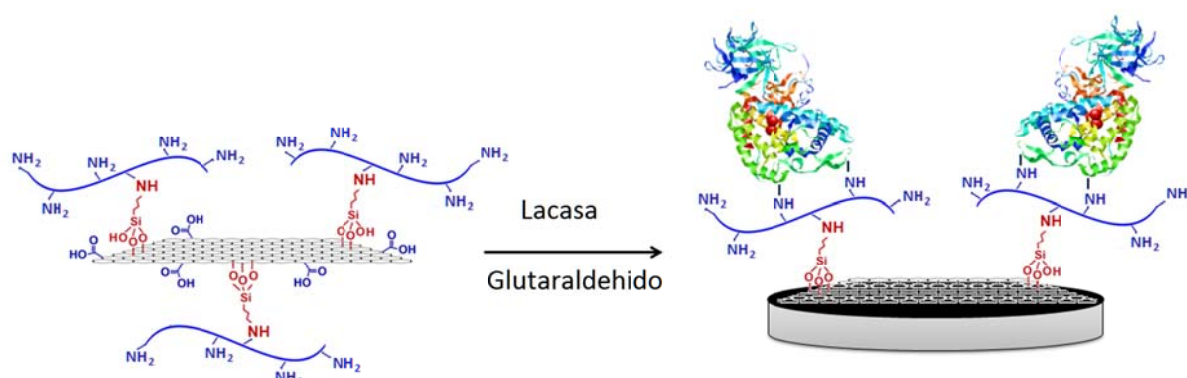


Figura 8.8. Representación esquemática del proceso de ensamblaje del electrodo enzimático.

Una representación esquemática de este proceso de ensamblaje del electrodo enzimático se muestra en la **Figura 8.8**.

8.1.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje.

Con el objetivo de obtener una señal analítica de calidad, de alta intensidad y bajo ruido electroquímico, se optimizaron todos los parámetros experimentales involucrados en la construcción del electrodo enzimático. Estos experimentos de optimización fueron realizados empleando catecol como compuesto fenólico modelo, teniendo en cuenta la pendiente de los calibrados obtenidos mediante amperometría en disoluciones agitadas en un rango de concentraciones de este analito entre 1 μM y 6 μM . Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

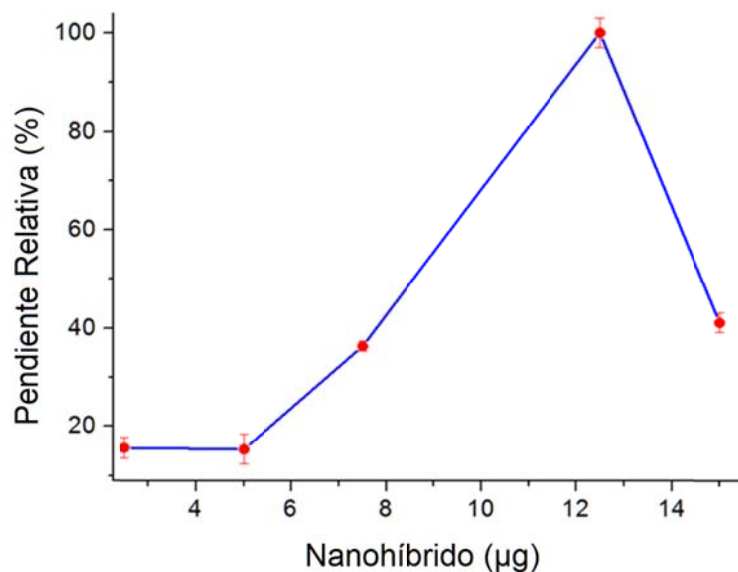


Figura 8.9. Influencia de la cantidad de nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

En primer lugar se optimizó la cantidad de nanohíbrido depositada sobre la superficie del electrodo, y los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 8.9**. Inicialmente se observó un aumento de la intensidad de corriente obtenida a -0.15 V (vs. Ag/AgCl) al aumentar la cantidad de nanomaterial desde 5 µg a 12.5 µg. Por el contrario, la respuesta amperométrica obtenida con el electrodo enzimático fue menor para cantidades de nanomaterial superiores a 12.5 µg, lo cual puede atribuirse a la baja estabilidad de la capa de nanomaterial depositado. De acuerdo a estos resultados, se empleó esta cantidad de 12.5 µg de nanohíbrido como valor óptimo para modificar las superficies electródicas en estudios posteriores.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

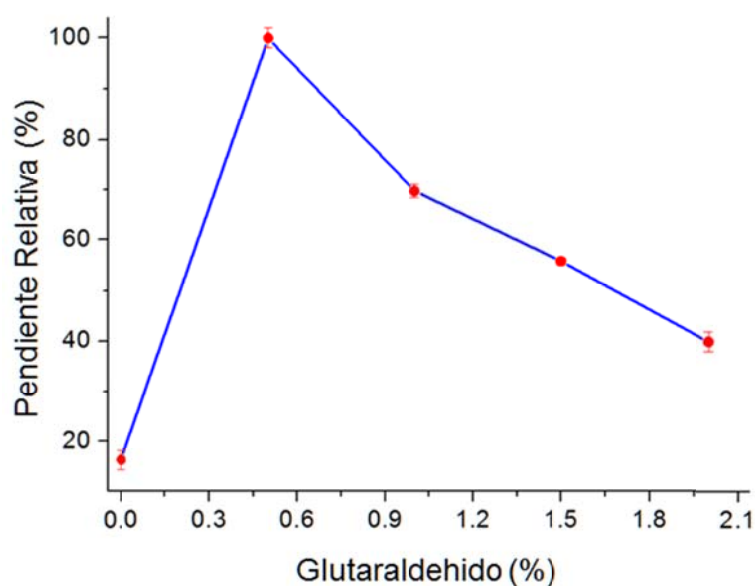


Figura 8.10. Influencia de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

En la **Figura 8.10** se muestra el efecto de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica del electrodo. Como era de esperar, la respuesta analítica del electrodo aumentó inicialmente con el aumento de la concentración de glutaraldehído empleada, hasta un valor máximo de 0.5% (v/v). Este hecho sugiere que el aumento de agente entrecruzante favorece la inmovilización de una mayor cantidad de enzima sobre la superficie del electrodo. Por el contrario, los valores de pendiente de las mediciones analíticas disminuyeron significativamente con el empleo de concentraciones mayores de glutaraldehído. Este comportamiento puede deberse a la inactivación progresiva de las moléculas de enzima al ser sometidas a altas concentraciones de agente entrecruzante, debido a la modificación exhaustiva de residuos de aminoácidos involucrados o cercanos al sitio activo del biocatalizador. Asimismo, el uso de altas concentraciones de glutaraldehído puede originar la formación de multicapas enzimáticas sobre la superficie electródica, donde

8. RESULTADOS Y DISCUSION

una buena proporción de enzimas no tengan capacidad de transformar el analito debido a problemas estéricos y difusionales. Por tal motivo, se empleó una concentración de glutaraldehído de 0.5% (v/v) como valor óptimo para inmovilizar la enzima sobre las superficies electródicas en estudios posteriores.

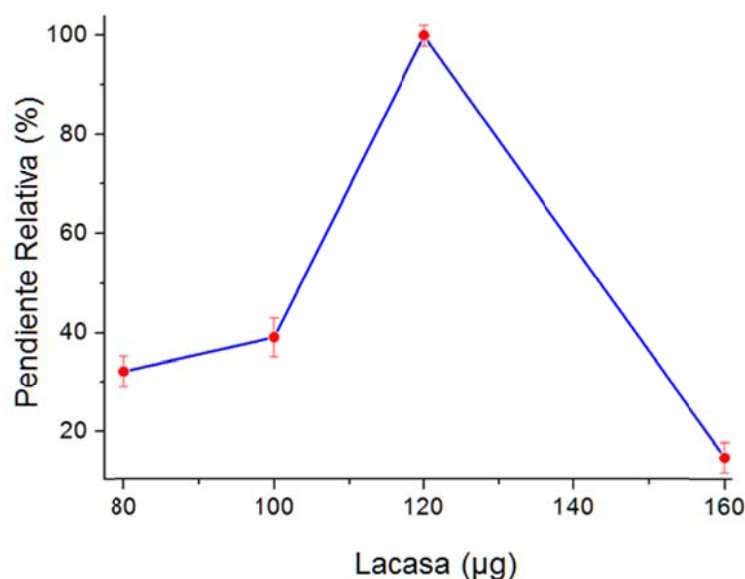


Figura 8.11. Influencia de la cantidad de enzima sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

Finalmente, se determinó el efecto de la cantidad de enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo empleando las condiciones óptimas de nanohíbrido y glutaraldehído antes descritas. Para estos estudios se procedió a evaluar la respuesta amperométrica obtenida con diferentes electrodos fabricados con distintas cantidades de lacasa, comprendidas entre 80 μg y 160 μg . Como se muestra en la **Figura 8.11**, la máxima respuesta analítica fue obtenida con los electrodos preparados con 120 μg de enzima, por lo cual este valor optimizado fue utilizado para la construcción de los electrodos enzimáticos posteriores.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.3.2. Caracterización del electrodo enzimático.

La superficie del electrodo enzimático se caracterizó empleando microscopía electrónica de barrido con emisión de campo. Como se puede observar en la **Figura 8.12**, el material depositado sobre el electrodo presentó una morfología tridimensional amorfa, donde no se encontraron zonas de grafeno sin modificar con la proteína. Este hecho indica una alta concentración de enzima inmovilizada sobre la superficie nanoestructurada del electrodo.

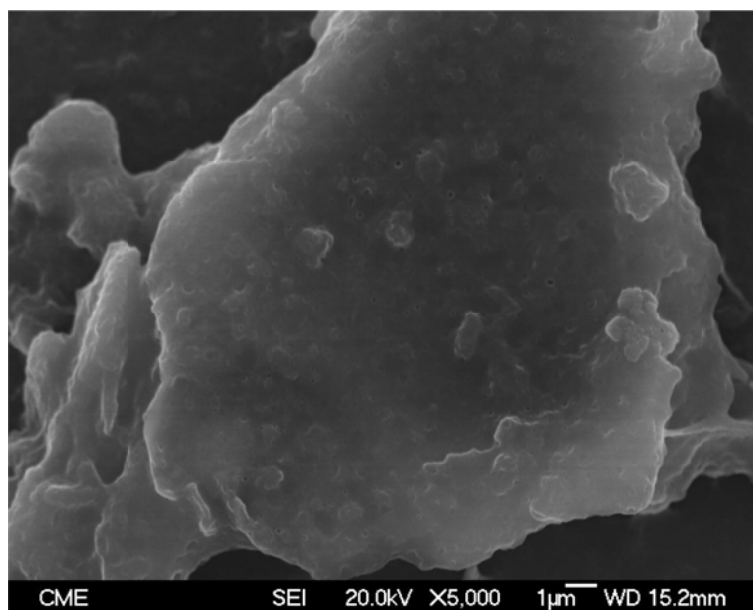


Figura 8.12. Imagen de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de la superficie del electrodo de lacasa inmovilizada sobre el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano.

Las distintas etapas del proceso de ensamblaje del electrodo enzimático se estudiaron mediante espectroscopia de impedancia electroquímica utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. Asimismo, en un experimento de control se midió el espectro de impedancia electroquímica de un electrodo de carbono vitrificado recubierto de óxido de grafeno. En la **Figura 8.13** se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos en estas mediciones. Para la interpretación de los resultados, los datos experimentales obtenidos en estas mediciones fueron ajustados a un modelo de circuito equivalente de Randles. Asimismo, en un

8. RESULTADOS Y DISCUSION

experimento de control se midió el espectro de impedancia electroquímica de un electrodo de carbono vitrificado recubierto de óxido de grafeno.

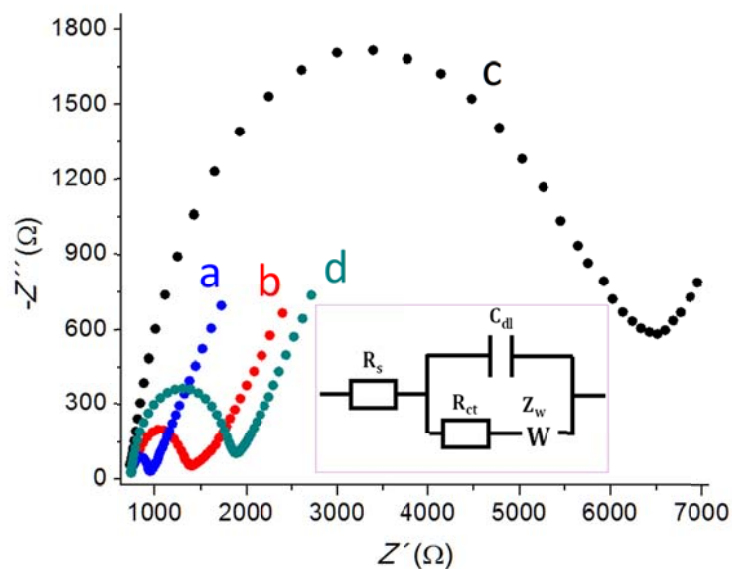


Figura 8.13. Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (b) y la enzima (c). Diagrama de Nyquist obtenido con un electrodo de carbono vitrificado modificado con óxido de grafeno (d). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1). Gráfico insertado: Circuito equivalente de Randles.

El recubrimiento del electrodo con el nanomaterial híbrido (curva b) provocó un aumento en la resistencia de los procesos de transferencia de carga interfaciales ($R_{TC} = 1115 \Omega$), lo cual se evidenció en el aumento del diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist con respecto al electrodo sin modificar ($R_{TC} = 420 \Omega$, curva a). Este fenómeno puede justificarse por las propiedades no conductoras y al elevado volumen hidrodinámico de las moléculas de polisacárido unidas covalentemente al nanomaterial.

El diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist aumentó aún más tras la inmovilización covalente de la enzima (curva c), lo cual implicó un aumento en la resistencia

8. RESULTADOS Y DISCUSION

de los procesos de transferencia de carga en esta superficie modificada ($R_{TC} = 6860 \Omega$). Este hecho se justifica por las propiedades no conductoras de las moléculas proteicas. Por otra parte, el gran aumento observado para la R_{TC} de la superficie electródica tras la inmovilización de la lacasa sugiere una alta densidad de moléculas de enzima distribuidas sobre la superficie nanoestructurada del electrodo. Estos resultados demuestran que el método utilizado para la preparación del electrodo enzimático hace posible una eficiente inmovilización de la enzima sobre la superficie electródica.

Al comparar los diagramas de Nyquist obtenidos con el electrodo modificado con el nanohíbrido (curva b) y con el óxido de grafeno (curva d), se evidenció una mayor resistencia de los procesos de transferencia de carga para esta última interfaz ($R_{TC} = 1700 \Omega$). Este hecho sugiere que las propiedades electroconductoras del nanomaterial fueron significativamente mejoradas tras su modificación covalente con el polisacárido iónico glicolquitosano. Tomando en consideración la naturaleza no conductora de este polímero, este resultado solo puede ser interpretado considerando la reducción parcial de las láminas de óxido de grafeno durante su transformación con el polisacárido aminado. Estos procesos de reducción implicarían la eliminación de los grupos funcionales oxigenados sobre las caras del nanomaterial y el consiguiente re-establecimiento parcial de la estructura reticular de grafito en el nanomaterial, lo cual implicaría un aumento de las propiedades electroconductoras del nanohíbrido resultante.

El comportamiento del electrodo enzimático frente al catecol fue estudiado mediante voltamperometría cíclica. Como control se preparó un electrodo empleando óxido de grafeno reducido como elemento de transducción. Los resultados de estos análisis se muestran en la **Figura 8.14**.

El voltamperograma realizado con el electrodo preparado con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano mostró, en presencia de catecol, un par de picos redox bien definidos correspondientes al sistema cuasi-reversible de catecol/*o*-benzoquinona.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

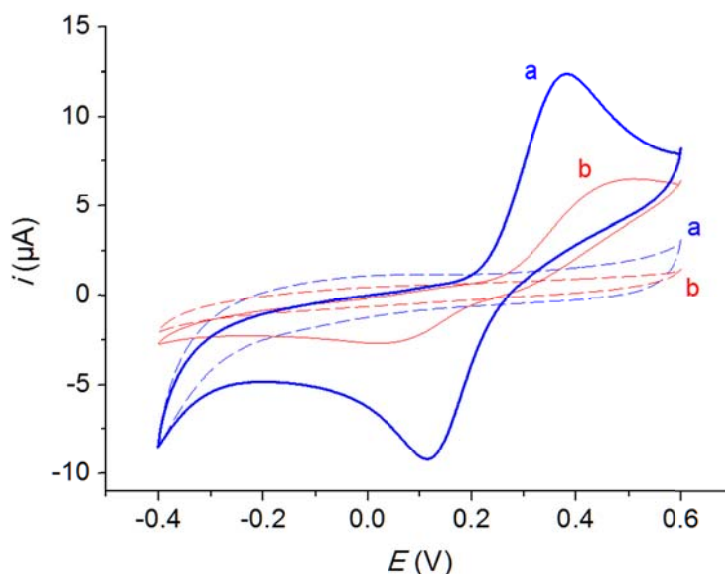


Figura 8.14. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 5.5, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de lacasa inmovilizada sobre carbono vitrificado recubierto con nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano (a) y óxido de grafeno reducido (b) en ausencia (líneas de puntos) y presencia (líneas continuas) de catecol 60 μM .

Por el contrario, el voltamperograma adquirido con el electrodo enzimático ensamblado solamente con el óxido de grafeno reducido como elemento de transducción mostró picos de oxidación-reducción más pequeños, a valores de potencial mucho más separados. Este hecho permite inferir una mayor densidad de lacasa catalíticamente activa inmovilizada sobre el electrodo nanoestructurado con el nanohíbrido, lo cual debe ser consecuencia de la presencia de una alta densidad de grupos amino primarios en las cadenas del polisacárido que sirven como puntos de anclaje para la inmovilización covalente y estable de la enzima mediante entrecruzamiento con glutaraldehído. Adicionalmente, la alta hidrofiliidad conferida al nanohíbrido por el polisacárido debe favorecer un microentorno favorable para el funcionamiento y mantenimiento de la conformación catalíticamente activa de la enzima, lo cual se debe traducir en una mejor respuesta electroanalítica frente a catecol.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida.

Con el objetivo de emplear el electrodo enzimático ensamblado en la construcción de un biosensor amperométrico para la determinación de compuestos fenólicos, se evaluaron las condiciones óptimas de trabajo a emplear en estas mediciones analíticas.

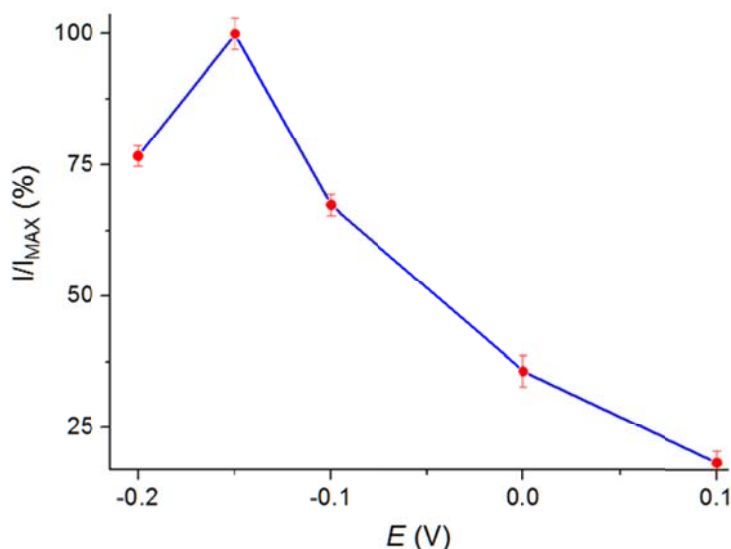


Figura 8.15. Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5.

En la **Figura 8.15** se muestra la influencia del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre -0.2 V y 0.1 V vs Ag/AgCl, sobre los valores de la pendiente normalizada de los calibrados para rango de concentración de catecol comprendido entre 1 μ M y 6 μ M, en una disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5. Como puede apreciarse, los mayores valores de pendiente de los calibrados fueron obtenidos en los experimentos donde se aplicó un potencial de trabajo de -0.15 V, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

En la **Figura 8.16** se muestra el perfil de respuesta amperométrica de los electrodos enzimáticos frente a catecol, en función del pH de la solución de medida. Estos

8. RESULTADOS Y DISCUSION

experimentos fueron realizando utilizando como potencial de trabajo -0.15 V vs Ag/AgCl, y empleando disoluciones reguladoras de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH.

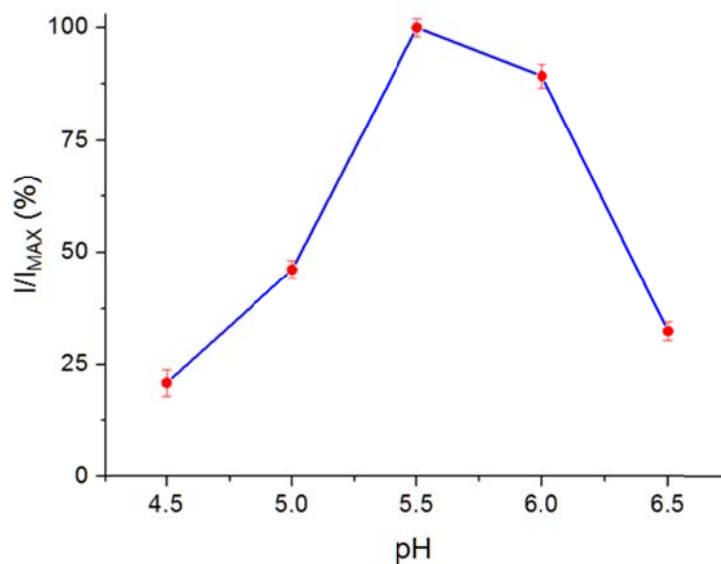


Figura 8.16. Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{apI} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

Los mejores resultados analíticos se obtuvieron en los experimentos donde la medición se realizó a pH 5.5, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores. Este valor de pH óptimo de trabajo concuerda con el descrito para la lacasa en solución [Bollag y Leonowicz, 1984], por lo cual podemos concluir que la inmovilización covalente sobre el nanohíbrido no afectó a esta característica de la enzima.

8.1.4. Características analíticas del biosensor.

8.1.4.1. Especificidad del biosensor.

El electrodo enzimático preparado con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido-glicolquitosano fue empleado en la construcción de un biosensor amperométrico para

8. RESULTADOS Y DISCUSION

compuestos fenólicos. Para ello se emplearon las condiciones experimentales de medida optimizadas, realizando las mediciones amperométricas en disoluciones agitadas.

Inicialmente, se comprobó la capacidad del biosensor para cuantificar distintos tipos de compuestos fenólicos. En la **Tabla 8.1** se recogen las propiedades analíticas del biosensor frente a estos compuestos. Como puede apreciarse, el biosensor construido fue capaz de determinar fenol, 3,4-xilenol, hidroquinona y 4-cloro-1-naftol a niveles de concentración del orden micromolar. Sin embargo, los mejores resultados analíticos de este biosensor fueron ante el catecol.

Tabla 8.1. Características analíticas del biosensor frente a diferentes compuestos fenólicos.

Analito	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad (mA/M)	r	Límite de Detección (nM)
Catecol	0.2 - 15	6.5	0.998	76
3,4-Xilenol	9.9 - 30	0.4	0.987	5000
Fenol	5 - 30	0.2	0.998	4900
Hidroquinona	5 - 30	2.0	0.999	2500
4-Cloro-1-naftol	5 - 19	0.78	0.997	4300

Estos resultados concuerdan con las características de especificidad de la lacasa, la cual es una polifenol oxidasa que presenta mayor afinidad por los difenoles que por los monofenoles [Thurton, 1994].

8.1.4.2. Curva de calibración y rango lineal.

En la **Figura 8.17** se ha representado la variación de la corriente medida con el biosensor enzimático tras sucesivas adiciones de catecol. El biosensor presenta una respuesta rápida tras la adición del analito, obteniéndose el 95% de la corriente en el estado estacionario solo 7 segundos después de la adición de catecol.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

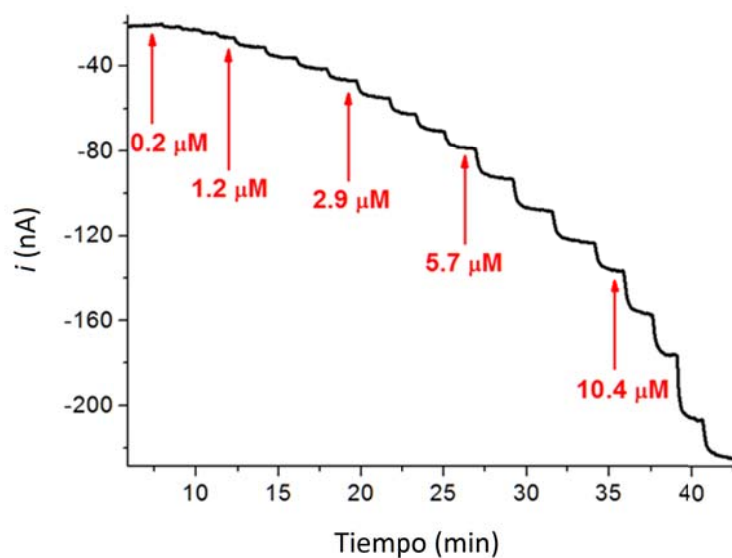


Figura 8.17. Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/Ag/Cl.

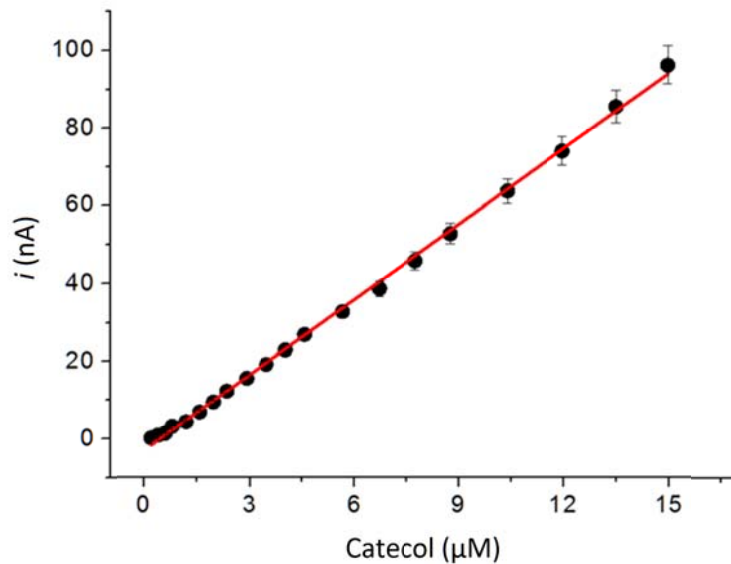


Figura 8.18. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de catecol empleando el biosensor enzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 5.5. $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/Ag/Cl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de intensidad de corriente vs concentración de catecol obtenidos en estos experimentos fueron empleados para la construcción de la curva de calibración del biosensor. La curva promedio resultante de estos estudios se muestra en la **Figura 8.18**.

El biosensor presentó un comportamiento lineal de la respuesta amperométrica frente a catecol en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.2 μM y 15 μM ($n = 10$, $r = 0.998$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i_c, \text{mA} = 6.5 \times [\text{catecol}], \text{M}^{-1} - 3.0 \times 10^{-6}$$

El intervalo lineal obtenido fue más amplio que los descritos previamente en la bibliografía para otros biosensores de lacasa, entre los que podemos destacar los diseños basados en materiales compósitos de nanotubos de carbono de pared múltiple/quitosano sobre electrodos de carbono vitrificado (1.2 – 30) μM [Liu *et al.*, 2006], carbón mesoporoso dopado con nitrógeno/filmes de alcohol polivinílico sobre electrodos de oro (0.39 - 8.98) μM [Guo *et al.*, 2014], electrodos de carbono vitrificado recubiertos con polianilina (3.2 - 19.6) μM [Nazari *et al.*, 2015], nanohíbridos de óxido de grafeno reducido/nanocajas de Pd-Pt depositados sobre electrodos de carbono vitrificado (1.7 - 5.2) mM [Mei *et al.*, 2015], electrodos de oro modificados con cisteamina (10 – 100) μM [Akyilmaz *et al.*, 2014], y materiales compósitos de nanopartículas de oro modificadas con fibras de zeina y Nafion depositados sobre electrodos de carbono vitrificado (0.17 – 7) μM [Chen *et al.*, 2015].

8.1.4.3. Sensibilidad del biosensor.

La sensibilidad del biosensor frente al catecol se determinó como la pendiente de la curva de calibrado entre el área electroactiva del electrodo. El valor obtenido fue de 92.5 $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$. Como muchos autores describen como valor de sensibilidad la pendiente de la curva de calibración, independientemente del valor de área electroactiva del electrodo, en este caso también mostramos como valor de sensibilidad 6.49 mA/M , en aras de facilitar la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

comparación de nuestros resultados con otros descritos en la literatura. En este sentido, en la **Tabla 8.2** se muestran las propiedades analíticas de biosensores de lacasa previamente descritos en la literatura.

Tabla 8.2. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de lacasa para catecol.

Electrodo	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad (mA/M)	LD (nM)	K_M (μM)	Referencia
Lac/Au	1 - 400	15	10^3	5400	[Gupta et al., 2003]
Lac/MCNT-CS/GCE	1.2 - 30	–	660	9.43	[Liu et al., 2006]
Lac/N-OMC/PVA/Au	0.39 - 8.98	290	310	6.28	[Guo et al., 2014]
Lac/CS/SiO ₂ -ZrO ₂ /GCE	1 - 100	8.8	350	–	[Qu et al., 2014]
Lac/PANI/GCE	3.2 - 19.6	706.7	$2 \cdot 10^3$	–	[Nazari et al., 2015]
Lac/rGO-PdCuNC/GCE	1655 - 5155	5.51	1500	–	[Mei et al., 2015]
Lac/Fe ₃ O ₄ -PANI/CS/CPE	0.5 - 80	–	400	1.09	[Sadeghi et al., 2015]
Lac/Cys/Au	10 - 100	–	4760	–	[Akyilmaz et al., 2014]
Lac/MCNT/GCE	20 - 1000	-	$2 \cdot 10^3$	-	[Qu et al., 2013 ^a]
Lac/CS/ZnO/GCE	1 - 100	10.52	290	-	[Qu et al., 2015]
Lac/NF/Au-CZF/GCE	0.17 - 7	1626	166	-	[Chen et al., 2015]
Lac/GCS-rGO/GCE	0.2 - 15	6.5	76	93.4	Presente trabajo

Lac: lacasa; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **CS:** quitosano; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **N-OMC:** carbón mesoporoso dopado con nitrógeno; **PVA:** alcohol polivinílico; **SiO₂-ZrO₂:** nanopartículas de sílice modificadas con óxido de zirconio; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **PdCuNC:** nanocajas de Pd-Cu; **Fe₃O₄:** nanopartículas de Fe₃O₄; **PANI:** polianilina; **CPE:** electrodo de pasta de carbón; **Cys:** cisteamina; **ZnO:** nanopartículas de óxido de zinc; **NF:** Nafión; **Au-CZF:** nanopartículas de oro modificadas con fibras de zeina; **GCS:** glicolquitosano.

8.1.4.4. Límite de detección del biosensor.

El límite de detección se calculó de acuerdo con el criterio $3 \cdot \text{SD}/m$, siendo m la pendiente del intervalo lineal del calibrado y SD la desviación estándar de las señales de

8. RESULTADOS Y DISCUSION

intensidad de corriente obtenidas para adiciones de patrón de catecol de concentración igual a la más baja medida en el calibrado [Keith *et al.*, 1983].

El límite de detección estimado para este biosensor fue de 76 nM (n=10), el cual fue menor que el descrito para otros biosensores de lacasa con diseños basados en materiales compósitos de nanotubos de carbono de pared múltiple/quitosano sobre electrodos de carbono vitrificado (660 nM) [Liu *et al.*, 2006], carbón mesoporoso dopado con nitrógeno/filmes de alcohol polivinílico sobre electrodos de oro (310 nM) [Guo *et al.*, 2014], electrodos de carbono vitrificado recubiertos con polianilina (2.0 μ M) [Nazari *et al.*, 2015], nanohíbridos de óxido de grafeno reducido/nanocajas de Pd-Pt depositados sobre electrodos de carbono vitrificado (1.5 μ M) [Mei *et al.*, 2015], electrodos de oro modificados con cisteamina (4.8 μ M) [Akyilmaz *et al.*, 2014], y materiales compósitos de nanopartículas de oro modificadas con fibras de zeina y Nafion depositados sobre electrodos de carbono vitrificado (166 nM) [Chen *et al.*, 2015].

8.1.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático.

Las constantes cinéticas aparentes $K_{M(ap)}$ e $I_{MAX(ap)}$ fueron determinadas empleando el método gráfico de Lineweaver-Burk. Para ello se representó el inverso de la intensidad de corriente en el estado estacionario para las señales obtenidas, las cuales se relacionan directamente con la velocidad de la reacción enzimática, frente al inverso de la concentración de catecol. Los valores calculados para estos parámetros cinéticos fueron $K_{M(ap)} = 93.4 \mu\text{M}$ e $I_{MAX(ap)} = 500 \text{ nA}$.

8.1.4.6. Repetitividad de las medidas.

Para estudiar la repetitividad entre medidas, se construyeron 10 calibrados sucesivos para catecol en el intervalo de concentraciones de 1 μ M a 6 μ M, empleando el mismo

8. RESULTADOS Y DISCUSION

biosensor enzimático. Tomando en considerando el valor medio y la desviación estándar de los valores obtenidos para la pendiente de dichos calibrados, se obtuvo un valor de desviación estándar relativa (R.S.D.) de 3.0%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena repetitividad de las medidas llevadas a cabo con el biosensor.

8.1.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

Desde un punto de vista práctico, uno de los aspectos más importantes en la tecnología de biosensores es la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes dispositivos construidos según el mismo protocolo. Esta propiedad asegura la utilidad práctica y confiabilidad del diseño propuesto.

En este trabajo se evaluó la reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor estudiando la respuesta amperométrica de 5 biosensores fabricados de la misma manera. La RSD calculada para 10 adiciones sucesivas de catecol 1 μM , medidas con estos biosensores, fue de 4.1%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena reproducibilidad del proceso de construcción del biosensor enzimático.

8.1.4.8. Interferencias.

En este trabajo se evaluó la influencia de diferentes compuestos químicos con potencial efecto interferente, sobre la medida del biosensor. Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de catecol de concentración 100 nM, en ausencia y presencia de concentraciones 10 veces mayores de los potenciales compuestos interferentes.

Como resultado de estos experimentos no se observó ningún efecto interferente para disoluciones 1 mM de D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, NO_3^- , 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, bisfenol A y ácido úrico. Sin embargo, se observó un incremento del 17% en el

8. RESULTADOS Y DISCUSION

valor de corriente catódica en estas mediciones en presencia de ácido ascórbico 1 mM, lo cual nos hace concluir que este compuesto es una sustancia interferente a tener en cuenta en análisis a realizar con este biosensor enzimático.

8.1.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor.

Para determinar la estabilidad de almacenamiento del biosensor enzimático, se prepararon 6 electrodos según el protocolo propuesto. Estos electrodos fueron agrupados en dos grupos de 3 unidades cada uno, los cuales fueron almacenados a 4 °C y en oscuridad, en condiciones de sequedad o inmersos en disolución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5. Los electrodos fueron periódicamente evaluados mediante la determinación de su respuesta amperométrica frente a catecol 1.0 μ M.

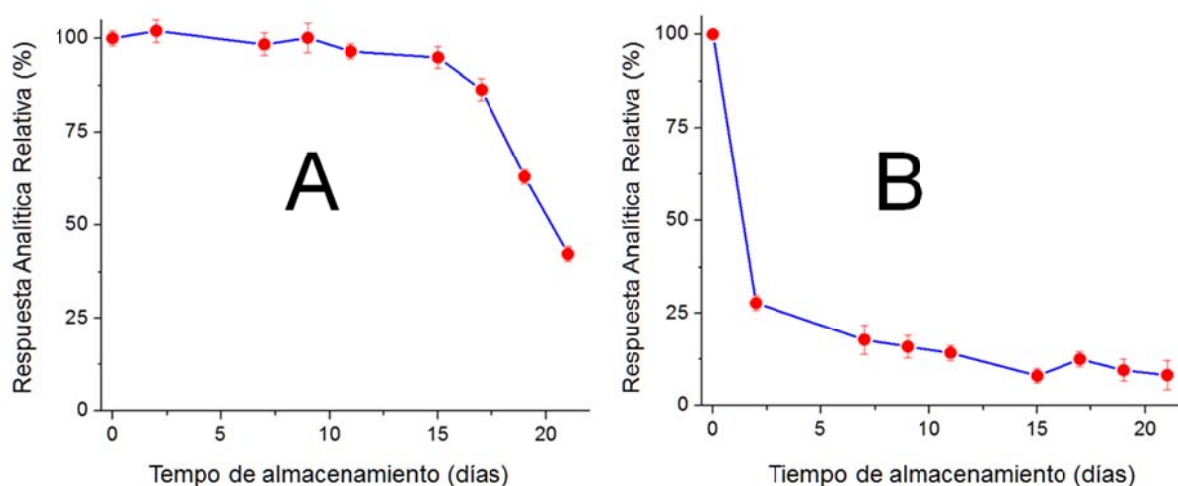


Figura 8.19. Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C, en solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5 (A) o en condiciones de sequedad (B), sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.

En la **Figura 8.19** se muestra la influencia del tiempo de incubación sobre la respuesta analítica normalizada de estos biosensores. El biosensor enzimático mostró una excelente

8. RESULTADOS Y DISCUSION

estabilidad de almacenamiento en disoluciones de fosfato de sodio, reteniendo toda su actividad electrocatalítica tras 15 días de almacenaje. Para mayores tiempos de almacenaje se evidenció una reducción progresiva de la capacidad analítica del biosensor, disminuyendo la intensidad de la señal analítica frente a catecol de acuerdo a un proceso cinético de primer orden. Como consecuencia, el biosensor retuvo aproximadamente el 42% de su capacidad analítica inicial tras 3 semanas de almacenamiento en disoluciones reguladoras de fosfato de pH 5.5.

Por el contrario, el biosensor mostró una rápida disminución de su actividad electrocatalítica al ser almacenado en condiciones de sequedad, reteniendo solo el 18% de su capacidad analítica inicial tras 1 semana de almacenamiento.

8.1.5. Evaluación del biosensor en la determinación del contenido de fenoles totales en muestras de infusiones.

El biosensor desarrollado fue evaluado como dispositivo analítico para la determinación cuantitativa del contenido total de compuestos fenólicos en distintas muestras de infusiones, en aras de demostrar su potencial uso práctico. Las muestras analizadas fueron infusiones comerciales de frutos rojos, té verde al limón y menta-poleo.

De forma paralela se determinó el contenido de fenoles totales en estas muestras mediante el método colorimétrico oficial para la determinación de fenoles totales, basado en el uso del reactivo de Folin-Ciocalteau [Ainsworth y Gillespie, 2007]. En ambos casos se empleó catecol como sustancia patrón, comprobándose que no había efecto matriz para estas determinaciones en ninguno de los dos métodos analíticos utilizados.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

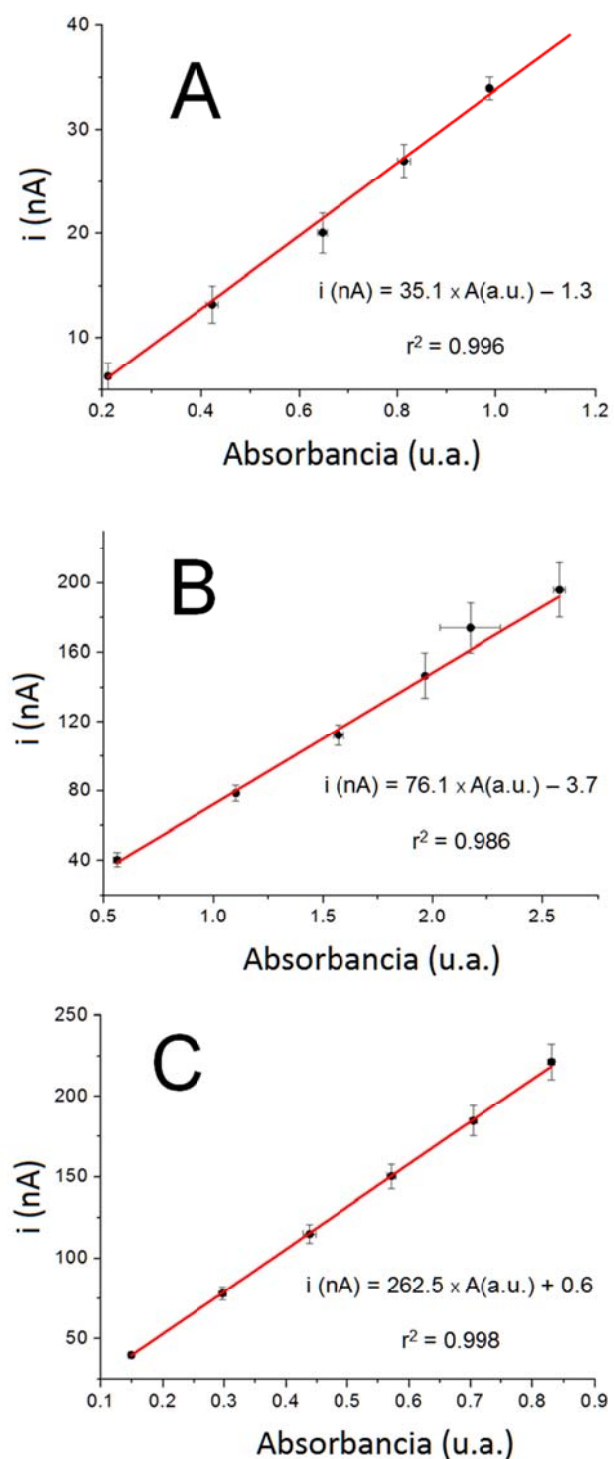


Figure 8.20. Relación entre las señales analíticas obtenidas con el biosensor y la absorbancia a 750 nm de las muestras de catecol analizadas por el método de Folin-Ciocalteu. A) Infusión de frutos rojos, B) Té verde al limón, y C) Infusión de menta-poleo.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En la **Figura 8.20** se muestra la relación existente entre las señales obtenidas con el biosensor electroquímico y mediante el método colorimétrico para cada una de las muestras analizadas. En todos los casos se comprobó la existencia de una correlación lineal entre las señales analíticas obtenidas por ambos métodos, lo cual valida el uso del biosensor electroquímico para estas determinaciones.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, se estimó una concentración de compuestos fenólicos totales en las muestras, expresado como miligramos de catecol por gramo de muestra seca, de 25 ± 2.8 , 13 ± 2 y 15 ± 3 para las infusiones de frutos rojos, menta-poleo y té verde al limón, respectivamente.

8.1.6. Evaluación del biosensor en la determinación simultánea de catecol y 4-aminofenol.

En aras de demostrar la mayor versatilidad de uso del biosensor electroquímico construido, se evaluó este dispositivo para la determinación simultánea de los compuestos fenólicos catecol y 4-aminofenol. Para ello se empleó voltamperometria diferencial de pulso como técnica electroquímica de análisis. Para la realización de estos ensayos de análisis simultáneos se prepararon muestras que contenían una concentración fija de uno de los compuestos fenólicos, variando el contenido del otro fenol. Los resultados de estas determinaciones electroquímicas se muestran en la **Figura 8.21**.

Los dos compuestos fenólicos generan señales voltamperométricas no solapadas y separadas por más de 260 mV, lo cual facilita una precisa determinación simultánea de estos compuestos. Como se observa en la **Figura 8.21A**, la intensidad del pico de corriente catódica correspondiente a la señal analítica del catecol aumentó linealmente con el aumento de la concentración de este analito en un rango de concentraciones de 1.0 μM a 69 μM , de acuerdo a la siguiente ecuación ($r = 0.996$):

$$i_c, \text{ mA} = 31.7 \times [\text{catecol}], \text{ M} + 3.7 \times 10^{-5}$$

8. RESULTADOS Y DISCUSION

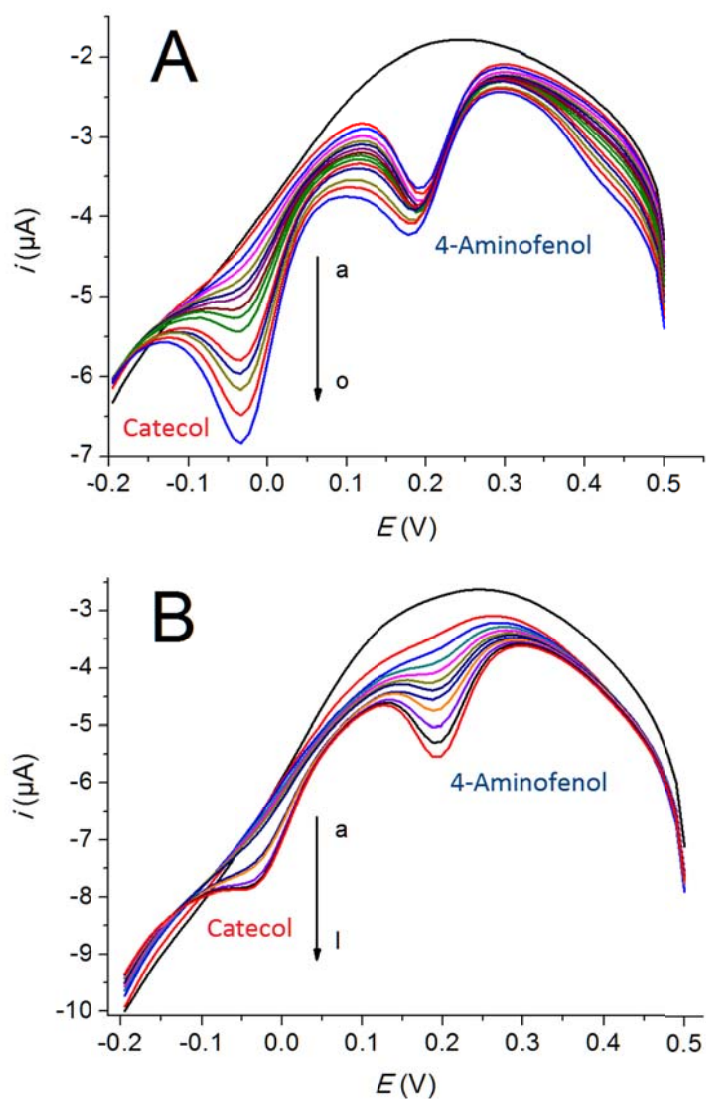


Figura 8.21. Voltamperogramas diferenciales de pulso adquiridos con el biosensor enzimático en solución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.5, bajo las siguientes condiciones: A) en presencia de 4-aminofenol 20 μM y diferentes concentraciones de catecol (a-o: 0, 1, 5, 10, 14, 18, 22, 25, 29, 33, 37, 40, 50, 58 y 69 μM), y B) en presencia de catecol 40 μM y diferentes concentraciones de 4-aminofenol (a-l: 0, 0.5, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18 y 20 μM).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El biosensor enzimático mostró un límite de detección de 800 nM (S/R = 3) y una sensibilidad de 454 mA/M cm² para esta determinación de catecol en presencia de 4-aminofenol.

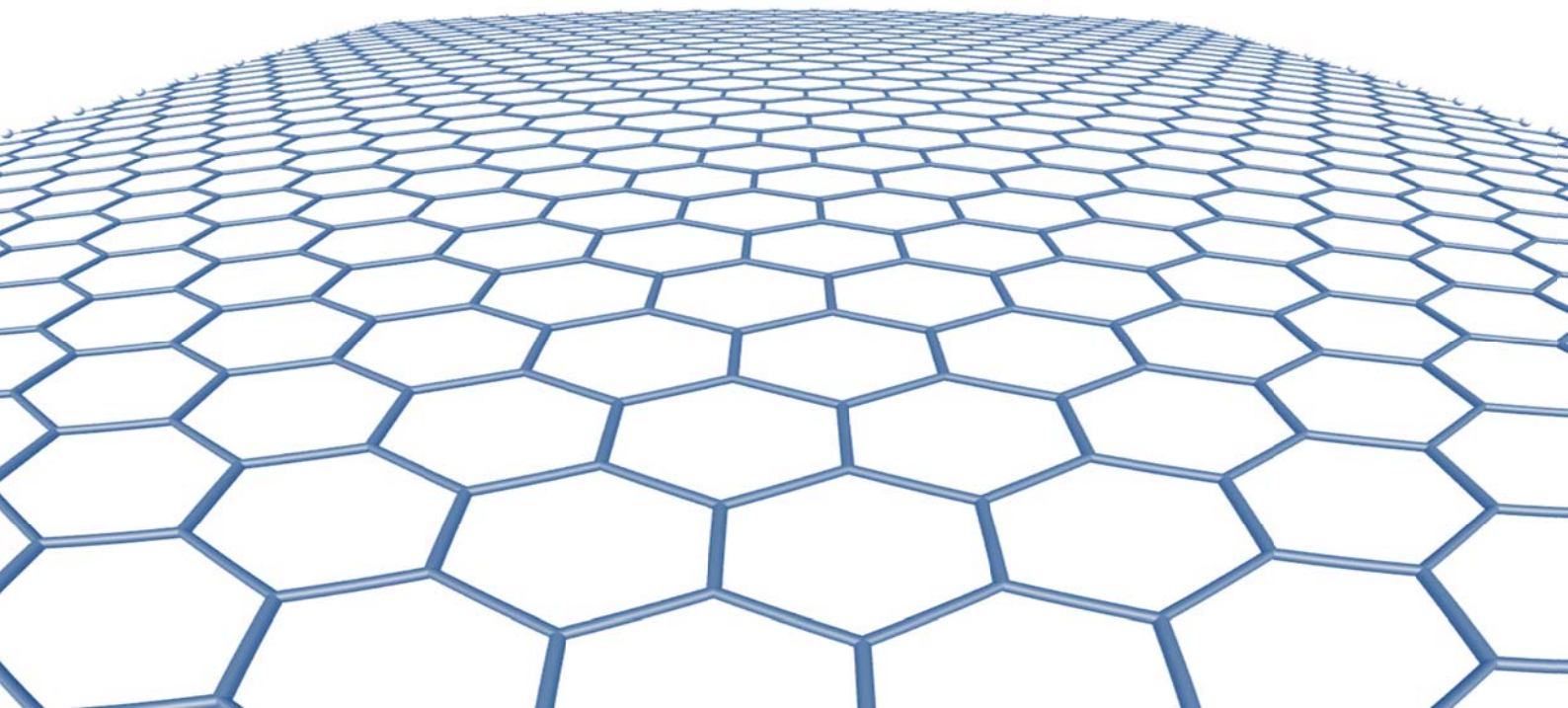
Por otra parte, el biosensor mostró un comportamiento electroanalítico similar frente a 4-aminofenol (**Figura 8.21A**), con un rango de respuesta lineal entre (0.5-20) μM (r = 0.995), regido por la siguiente ecuación:

$$i_c, \text{ mA} = 62.6 \times [(4\text{-aminofenol}], \text{ M} + 3.2 \times 10^{-5}$$

El biosensor mostró una sensibilidad de 897 mA/M cm² y un límite de detección de 310 nM (S/R = 3) para la determinación de 4-aminofenol en presencia de catecol.

8.2

Biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano



8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.2. Biosensor amperométrico para catecol basado en nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.

8.2.1. Preparación del nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con dextrano.

Con el objetivo de preparar un derivado del óxido de grafeno con altas prestaciones electroanalíticas, elevada electroconductividad y capaz de formar dispersiones estables en disoluciones acuosas, se diseñó una estrategia basada en la modificación sitio-específica del nanomaterial de carbono con moléculas de dextrano monoactivadas.

Para ello se propuso la silanización inicial del óxido de grafeno con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, en aras de modificar selectivamente los grupos hidroxilos situados sobre las láminas del nanomaterial sin afectar el resto de la estructura carbonácea. Esta silanización permite asimismo introducir grupos tioles activos sobre la estructura del óxido de grafeno. Un tratamiento posterior con NaBH_4 conduce a la reducción parcial del óxido de grafeno en aras de mejorar sus propiedades electroconductoras y asegura la reactividad de los grupos tioles que pudieran haberse oxidado mediante la formación de puentes disulfuro durante la reacción de silanización. Estos grupos tioles reactivos son posteriormente empleados como sitios de unión para la decoración con nanopartículas de oro mediante procesos de quimisorción.

En una etapa final, el derivado del óxido de grafeno fue funcionalizado con moléculas de dextrano monotioladas mediante modificación superficial de las nanopartículas de oro. A partir de esta estrategia sitio-selectiva se pretendió dotar al nanomaterial con una alta densidad zonal de cadenas hidrofílicas de dextrano sin afectar sensiblemente la superficie electroconductora del nanomaterial.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Un esquema de los procesos involucrados en la preparación de este nanohíbrido se representa en la **Figura 8.22**.

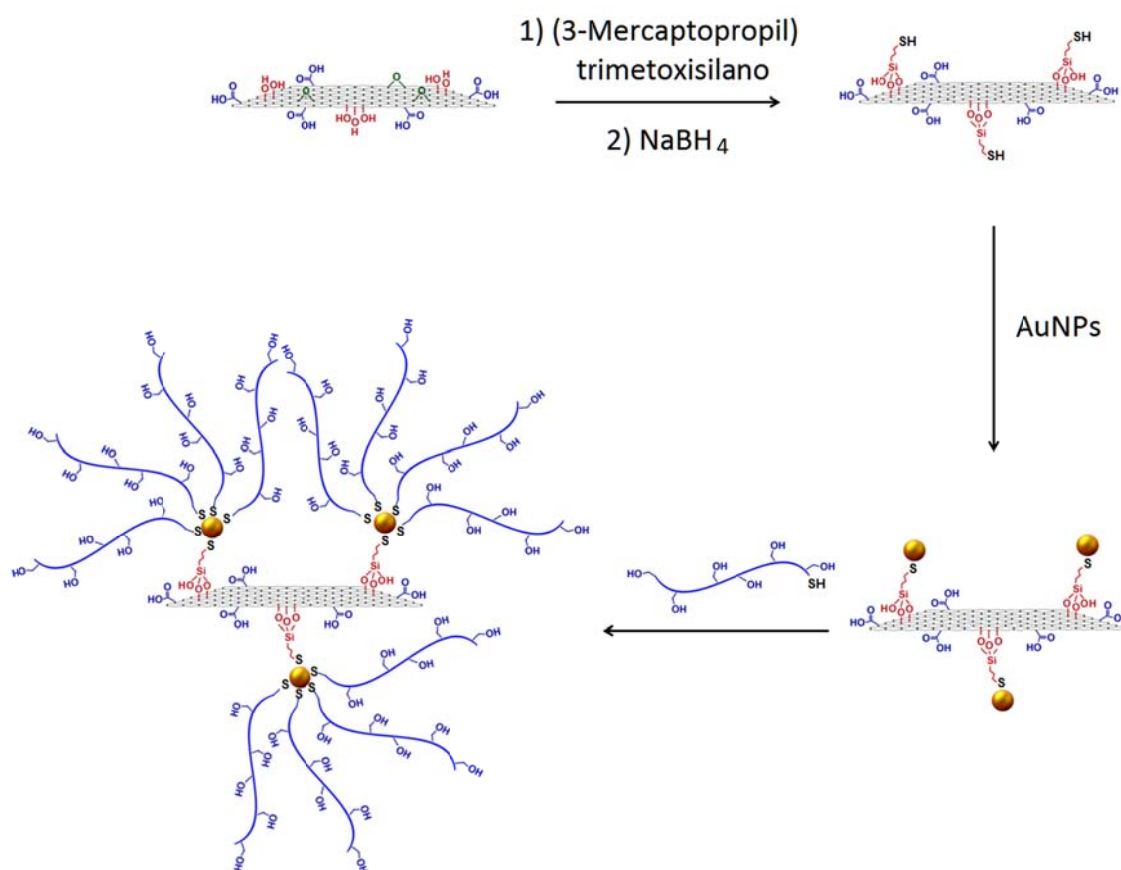


Figura 8.22. Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.

Para preparar este nanohíbrido se sintetizó inicialmente un derivado monotiolado de dextrano de baja masa molecular ($M_w = 4000$, grado de polimerización = 22) mediante alquilación reductiva del residuo terminal del polisacárido con cistamina en presencia de NaBH_3CN [Pérez *et al.*, 2005; Villalonga *et al.*, 2005]. El derivado sintetizado fue posteriormente reducido con NaBH_4 para liberar los grupos tiol del derivado de cistamina y reducir los grupos hemiacetálicos de los anillos de D-glucosa terminal no tiolados. El

8. RESULTADOS Y DISCUSION

esquema de las reacciones involucradas en la síntesis del derivado monotiolado de dextrano se representa en la **Figura 8.23**.

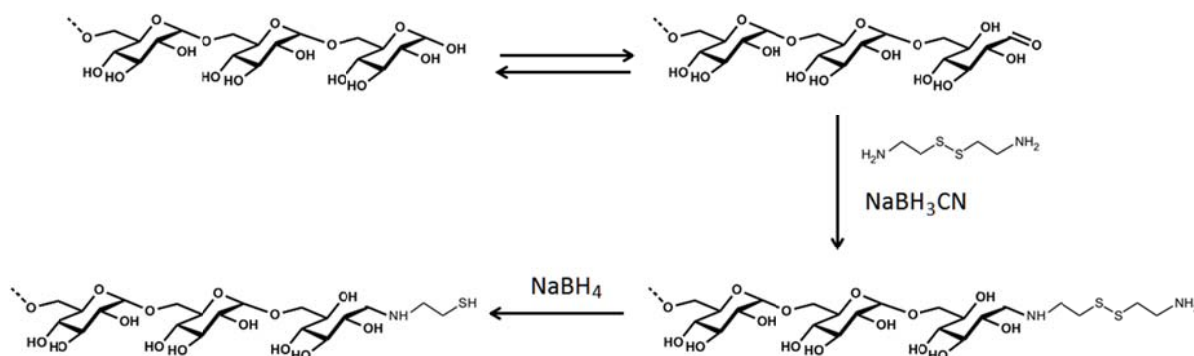


Figura 8.23. Representación esquemática de las reacciones involucradas en la síntesis del derivado monotiolado de dextrano.

Este derivado polimérico fue caracterizado mediante ^1H -RMN, y tanto su espectro como el del dextrano de origen se muestran en la **Figura 8.24**.

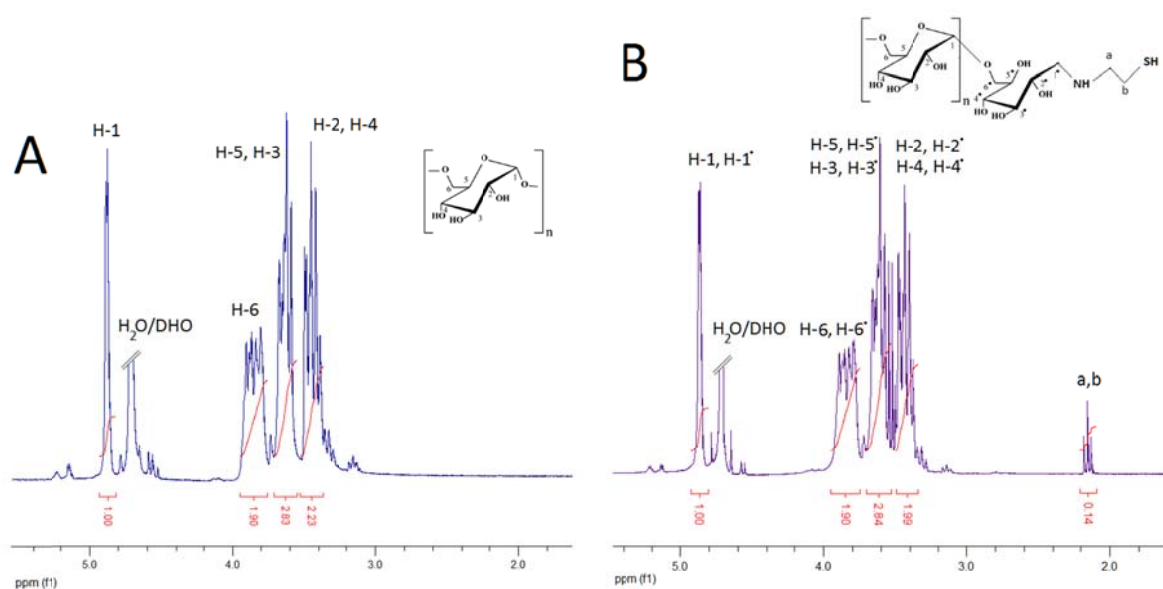


Figura 8.24. Espectros de ^1H -RMN del dextrano (A) y su derivado monotiolado (B).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis por ^1H -RMN del polisacárido de partida dio como resultado un espectro característico para el dextrano, lo cual fue confirmado mediante la asignación e integración de las señales de resonancia (**Figura 8.24A**). Por otra parte, la aparición de la señal a 2.17 ppm en el espectro de la **Figura 8.24B**, correspondiente a los grupos $-\text{CH}_2$ de la cisteamina, confirmó la unión de este aminotiol al monosacárido terminal de la dextrana. El grado de modificación de este polisacárido fue determinado igual a 77%, tomando en consideración tanto el grado de polimerización del dextrano como la integración de las señales correspondientes a la cisteamina y al hidrógeno en el átomo de carbono anomérico del polímero.

La reacción de este derivado polimérico con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro produjo un sólido negro con el cual fue posible preparar dispersiones acuosas de concentraciones tan altas como 1.3 mg/mL, las cuales se mantuvieron estables por más de un mes a temperatura ambiente.

8.2.2. Caracterización del nanomaterial híbrido.

El nanomaterial híbrido preparado se caracterizó mediante diferentes técnicas espectroscópicas y de microscopía, tales como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, termogravimetría, espectroscopia Raman, difracción de rayos X, microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica de barrido con emisión de campo y microscopía electrónica de transmisión.

8.2.2.1. Caracterización del nanohíbrido mediante FT-IR.

Los espectros FT-IR del nanohíbrido y los derivados de óxido de grafeno involucrados en su preparación se muestran en la **Figura 8.25**.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El espectro FT-IR del óxido de grafeno (espectro a) presentó las bandas características de este nanomaterial [Mermoux *et al.*, 1991], previamente descritas en la **Sección 8.1.2.1**. Por otra parte, la modificación de este nanomaterial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano fue confirmada en por el incremento en la intensidad de la banda a 1064 cm^{-1} debido a la vibración asimétrica de los enlaces Si-O-C (espectro b), así como por la aparición de la banda a 750 cm^{-1} asociada a la flexión de los grupos Si-O-C.

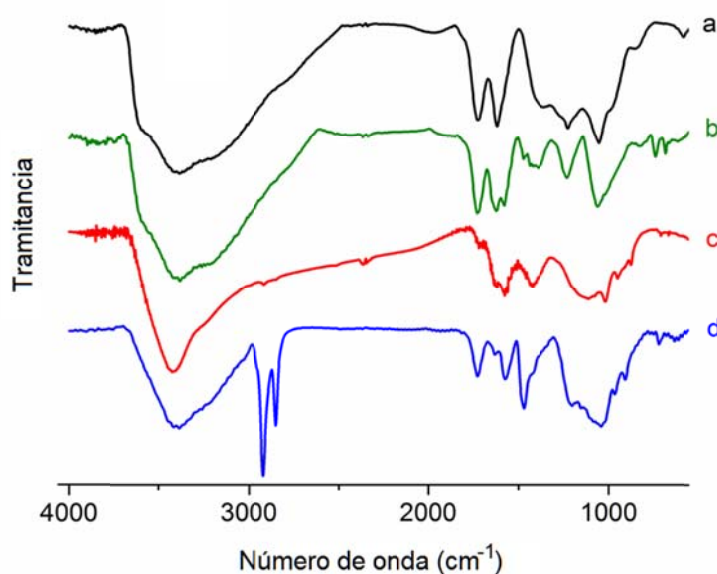


Figura 8.25. Espectros FT-IR del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).

La decoración del nanomaterial con las nanopartículas de oro no pudo ser confirmada a partir del espectro FT-IR de este derivado (espectro c). Sin embargo, la modificación posterior con las cadenas de dextrano monotiolado fue corroborada por la presencia de la banda ancha centrada en 3403 cm^{-1} característica de la vibración de los grupos O-H (espectro d), las bandas intensas a 2915 cm^{-1} y 2843 cm^{-1} correspondientes a la vibración de los grupos C-H, y las bandas de deformación de los grupos O-H y C-O-C a 1460 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} , respectivamente.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.2.2.2. Caracterización del nanohíbrido por termogravimetría.

Los termogramas obtenidos en los experimentos de caracterización de los derivados de óxido de grafeno preparados en este trabajo se muestran en la **Figura 8.26**.

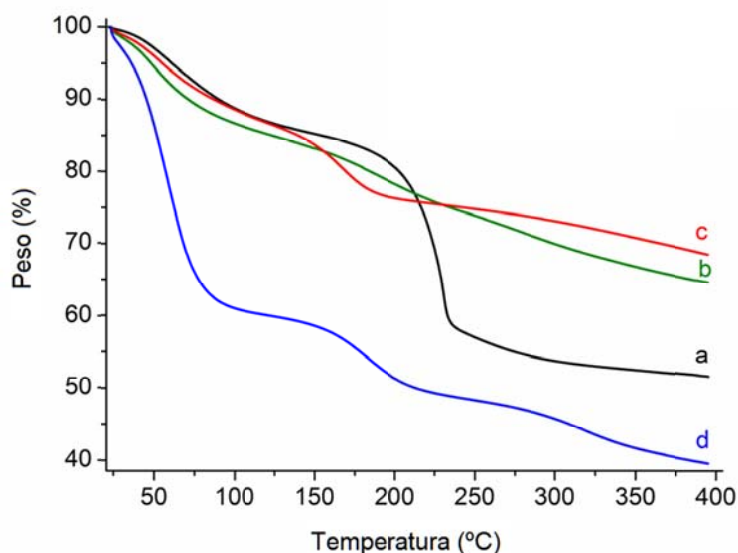


Figura 8.26. Análisis termogravimétrico del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).

Todos los nanomateriales analizados mostraron una pérdida de masa en el rango de temperaturas entre 25°C -110°C, debido a la desorción térmica de las moléculas de agua adsorbidas en estos productos. El óxido de grafeno presentó un perfil de descomposición térmica similar al descrito en la **Sección 8.1.2.2**, con una única etapa de transformación térmica con máxima velocidad de descomposición a 231°C en la cual se perdió el 30.7% del peso seco de la muestra. Como se comentó anteriormente, esta pérdida de peso puede estar asociada a la degradación de los grupos funcionales del oxígeno en el nanomaterial.

La modificación secuencial del óxido de grafeno con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano y nanopartículas de oro redujo la estabilidad térmica del nanomaterial, con disminución de los valores de temperatura de máxima velocidad de descomposición térmica de 231°C a 188°C y

8. RESULTADOS Y DISCUSION

169°C, respectivamente. Sin embargo, se observó menores pérdidas de peso para ambos derivados durante dicha transformación térmica, lo cual puede ser justificado por el proceso de reducción parcial al cual fue sometido el nanomaterial de partida mediante tratamiento con NaBH_4 , con la consiguiente eliminación de los grupos carbonilo y epóxido sobre las láminas del óxido de grafeno.

La posterior decoración con el derivado de dextrano monotiolado produjo una mayor adsorción de agua en el nanohíbrido, lo cual pudo ser constatado a partir de la mayor pérdida de peso (40%) en el rango de temperaturas entre 25-100°C. Este mayor contenido de agua no estructural en el nanohíbrido puede ser justificado por la alta hidrofiliidad de las moléculas de dextrano. Asimismo, el nanohíbrido sufrió una segunda transformación térmica, con máxima velocidad de descomposición a 187°C y pérdida del 10.6% del peso seco. Esta transformación puede deberse a la descomposición de los grupos funcionales del oxígeno remanentes en el óxido de grafeno reducido, así como a procesos de deshidratación del polisacárido. El nanohíbrido mostró una tercera etapa de transformación térmica en el rango de temperaturas entre 290°C-380°C, lo cual puede atribuirse a la descomposición total de las moléculas de dextrano.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos mediante análisis termogravimétrico del nanohíbrido, se determinó un contenido total de dextrano en este material del 10.4% en peso.

8.2.2.3. Caracterización del nanohíbrido mediante espectroscopia Raman.

Los derivados de óxido de grafeno preparados fueron caracterizados mediante espectroscopia Raman. Como se muestra en la **Figura 8.27**, el óxido de grafeno de partida mostró un espectro Raman similar al descrito en la **Sección 8.1.2.3**. Como se observa en el espectro b, las bandas G y D del nanomaterial de partida experimentaron ligeros desplazamientos de 1584 cm^{-1} a 1588 cm^{-1} y de 1344 cm^{-1} a 1347 cm^{-1} , respectivamente, tras

8. RESULTADOS Y DISCUSION

la modificación del óxido de grafeno con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, manteniéndose la relación de intensidades D/G igual a 0.96.

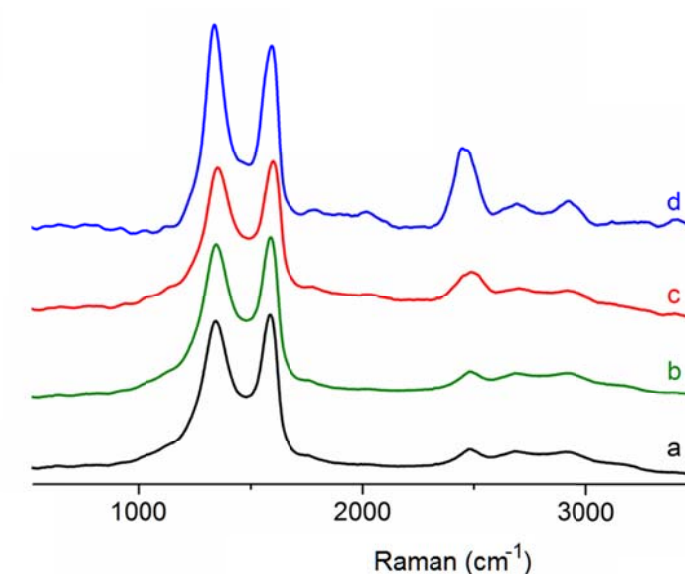


Figura 8.27. Espectros Raman del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).

Sin embargo, la posterior modificación de este nanomaterial con nanopartículas de oro incrementó la relación de intensidades de las bandas D/G hasta 1.10. El mismo valor fue asimismo calculado para dicho parámetro en el derivado modificado con las moléculas de dextrano. Estos hechos sugieren una fuerte interacción química entre las nanopartículas de oro y las láminas de grafeno, como ha sido previamente descrito en la literatura [Siamaki *et al.*, 2011; Subrahmanyam *et al.*, 2010].

Por otro lado, la decoración del derivado de óxido de grafeno con las nanopartículas de oro en presencia de NaBH₄ causó un notable incremento en la intensidad de la banda 2D a 2459 cm⁻¹, lo cual también fue observado en el espectro Raman del derivado modificado con

8. RESULTADOS Y DISCUSION

dextrano. Este hecho hace suponer la ocurrencia de apilados parciales entre las láminas del nanomaterial tras su tratamiento reductivo con NaBH_4 [Hao *et al.*, 2010].

8.2.2.4. Caracterización del nanohíbrido mediante difracción de rayos X.

Los derivados de grafeno resultantes en las distintas etapas de la síntesis del material híbrido fueron caracterizados mediante difracción de rayos X en polvo, obteniéndose los difractogramas mostrados en la **Figura 8.28**.

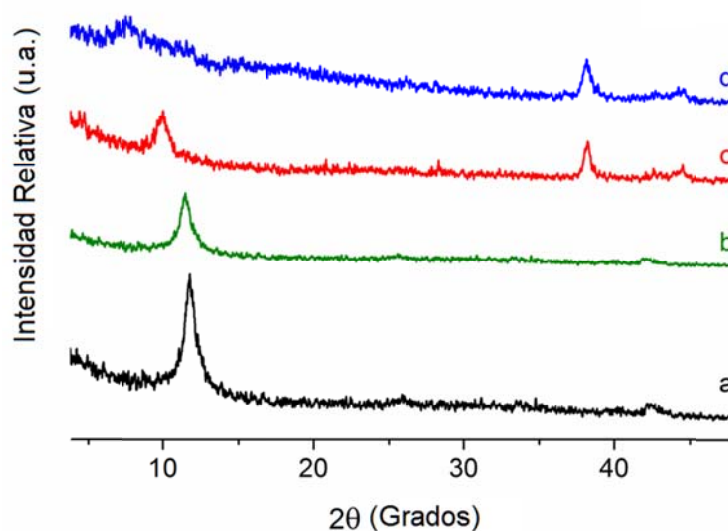


Figura 8.28. Análisis mediante difracción de rayos X del óxido de grafeno antes (a) y después de su modificación secuencial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (b), nanopartículas de oro (c) y dextrano monotiolado (d).

El óxido de grafeno mostró un patrón de difracción característico al de una estructura con pocas láminas de grafeno, con un pico de difracción intenso a 11.74° correspondiente a una distancia interplanar de 7.54 \AA (difractograma a). Esta distancia interplanar, mayor que la existente entre las láminas de grafeno en el grafito (0.340 nm) [Lu *et al.*, 2009], es debida a la presencia de grupos funcionales con oxígeno en los bordes y plano basal del nanomaterial, así como a la intercalación de moléculas de agua entre las láminas hidrofílicas del óxido de grafeno [Park *et al.*, 2009].

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Este pico aparece con menos intensidad y desplazado a 11.48° (7.70 Å), 9.99° (8.85 Å) y 7.54° (11.71 Å) tras la modificación secuencial del nanomaterial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (difractograma b), nanopartículas de oro (difractograma c) y dextrano monotiolado (difractograma d), respectivamente. Este incremento progresivo en la distancia interplanar de los derivados preparados puede ser justificada por el gran volumen de los grupos tioles, nanopartículas metálicas y cadenas del polisacárido unidos sobre la superficie del nanomaterial.

Cabe destacar que en los difractogramas c y d de la **Figura 8.28** se observan picos a 38.21° y 44.49° , los cuales se corresponden con las reflexiones de los planos (111) y (200) de la estructura fcc del oro, lo cual confirma la presencia de las nanopartículas de este metal en estos derivados de grafeno.

8.2.2.5. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo.

La morfología del nanomaterial preparado fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo. Como se muestra en la **Figura 8.29**, el nanohíbrido mostró una morfología de láminas ligeramente plegadas, las cuales forman nanoestructuras tridimensionales voluminosas.

Sobre estas estructuras laminares se aprecian claramente las nanopartículas de oro, las cuales se encuentran distribuidas al azar por toda la capa del nanomaterial de carbono. Cabe destacar que la densidad de estas nanopartículas no es alta, apreciándose grandes áreas no decoradas con estas estructuras. Asimismo, muchas de estas nanopartículas se encuentran aglomeradas sobre determinadas zonas de la superficie del óxido de grafeno reducido, formando grupos de hasta más de 10 nanopartículas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

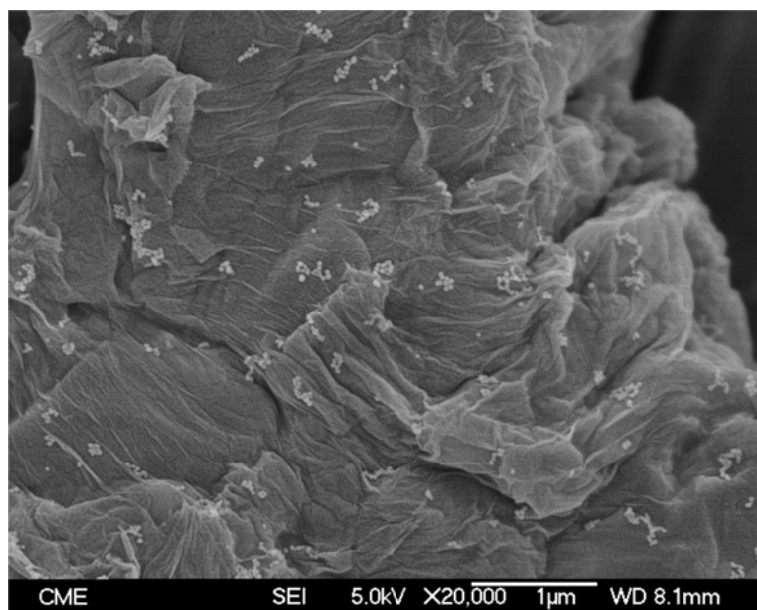


Figura 8.29. Imagen de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.

Esta morfología coincide con la estructura esperada para el nanohíbrido, tomando en consideración que la modificación inicial con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano solo debe ocurrir en las zonas oxidadas del óxido de grafeno. Este hecho condiciona que la decoración posterior con las nanopartículas de oro ocurra solamente en dichos puntos de silanización.

8.2.2.6. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía electrónica de transmisión.

En la **Figura 8.30** se muestran imágenes características del nanohíbrido preparado, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de baja y alta resolución.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

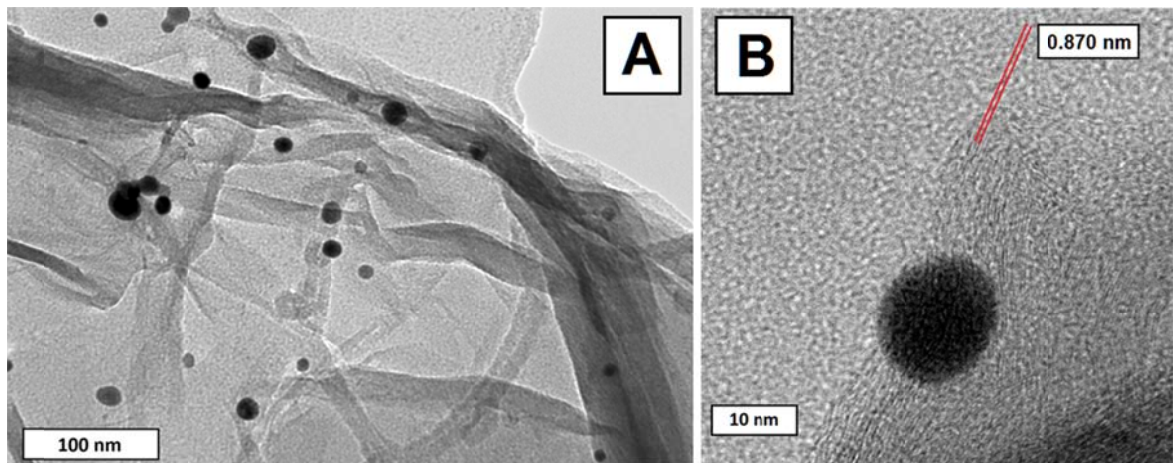


Figura 8.30. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de baja (A) y alta resolución (B) del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano.

El nanomaterial mostró una estructura de láminas extendidas, con algunos pliegues, sobre las cuales se observan con nitidez las nanopartículas de oro. El análisis de los bordes de este nanomaterial, mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, mostró la presencia de varias capas apiladas del derivado de grafeno. La distancia interplanar entre dichas capas fue de 0.870 nm, valor mucho mayor que la distancia interplanar descrita para las láminas de grafeno en el grafito (0.340 nm) [Lu *et al.*, 2009]. Este incremento en la distancia interplanar en el nanohíbrido preparado puede deberse a la presencia de las nanopartículas de oro y las cadenas de dextrano unidas al nanomaterial, lo cual incrementa el volumen interplanar y reduce las interacciones entre las láminas de grafeno.

8.2.2.7. Caracterización del nanohíbrido mediante microscopía de fuerza atómica.

En la **Figura 8.31** se muestra el análisis mediante microscopía de fuerza atómica, en modo de contacto intermitente, del derivado de grafeno decorado con nanopartículas de oro antes y después de su modificación con el derivado monotiolado de dextrano. En ambos

8. RESULTADOS Y DISCUSION

casos se comprobó la presencia de las nanopartículas de oro unidas a la superficie de las láminas de grafeno.

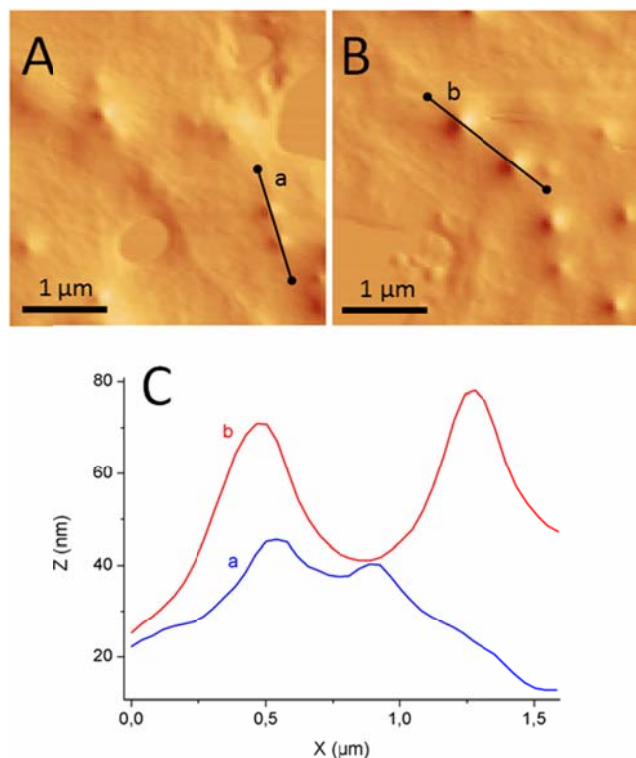


Figura 8.31. Imágenes de microscopía de fuerza atómica, medidas en modo de contacto intermitente (*tapping*), del nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro antes (A) y después de su funcionalizadas con brochas de dextrano (B). C: Perfil de alturas de la sección transversal del nanohíbrido antes (a) y después de su funcionalizadas con brochas de dextrano (b).

El análisis del perfil de alturas, obtenido sobre una sección transversal de zonas donde dichas nanoestructuras se encontraran presentes, permitió confirmar que estas nanopartículas presentaban un diámetro promedio de 20 nm. Asimismo, se comprobó que el diámetro determinado para estas nanopartículas tras su modificación con el derivado de dextrano aumentó en 3.9 veces. Este hecho permite sugerir una alta densidad de moléculas de polisacáridos unidas a la superficie de las nanopartículas, lo cual produce una extensión

8. RESULTADOS Y DISCUSION

longitudinal de dichas cadenas en un patrón tipo brochas, causando un incremento inusual en el tamaño de las nanopartículas modificadas.

8.2.3. Ensamblaje del electrodo enzimático de tirosinasa.

El nanomaterial híbrido preparado fue empleado como elemento de transducción para el ensamblaje de un electrodo enzimático de tirosinasa, con el objetivo de construir un biosensor amperométrico para la determinación de catecol. Este proceso de inmovilización fue realizado con glutaraldehído, el cual favorece tanto el entrecruzamiento covalente y estable de las moléculas de la enzima mediante la unión de sus grupos ϵ -amino primarios, como la unión de estos con los grupos hidroxilos del polisacárido mediante la formación de enlaces hemiacetales.

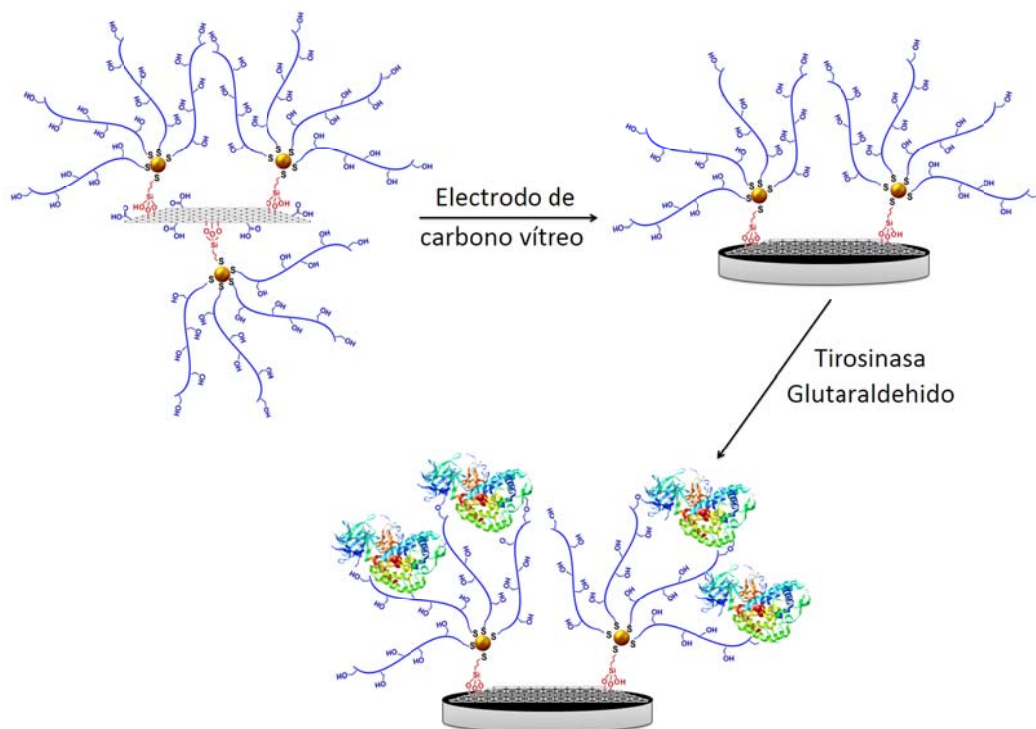


Figura 8.32. Representación esquemática del proceso de ensamblaje del electrodo de tirosinasa.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En la **Figura 8.32** se muestra una representación esquemática de este proceso de ensamblaje del electrodo enzimático.

8.2.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje.

Los parámetros experimentales involucrados en la construcción del electrodo enzimático fueron optimizados, empleando catecol como analito. Como variable respuesta se tomó la señal analítica obtenida mediante amperometría en disoluciones agitadas tras la adición de catecol (concentración final en celda: 2 nM). Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

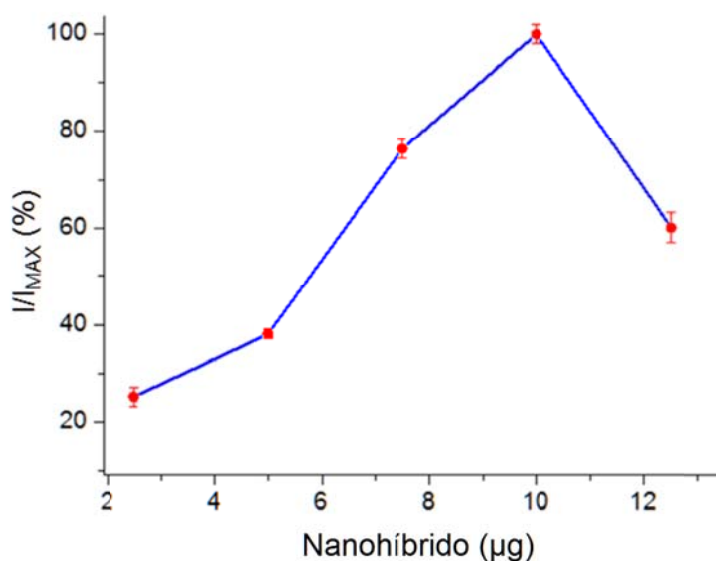


Figura 8.33. Influencia de la cantidad de nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

En la **Figura 8.33** se muestra la respuesta del electrodo enzimático en función de la cantidad de nanohíbrido depositada sobre la superficie del electrodo. La intensidad de

8. RESULTADOS Y DISCUSION

corriente obtenida a -100 mV vs Ag/AgCl aumenta con la cantidad de nanomaterial depositado, alcanzándose un máximo para los electrodos preparados con 10 μg del nanohíbrido. Por otra parte, se observó una disminución de la señal analítica frente a catecol 2 nM para los electrodos enzimáticos preparados con mayor cantidad del nanomaterial. Este fenómeno puede estar asociado a la baja estabilidad mecánica de la capa de nanomaterial depositado, lo cual puede conllevar a su desprendimiento parcial de la superficie del electrodo. De acuerdo a estos resultados, se empleó 10 μg de nanohíbrido para preparar los electrodos a utilizar en estudios posteriores.

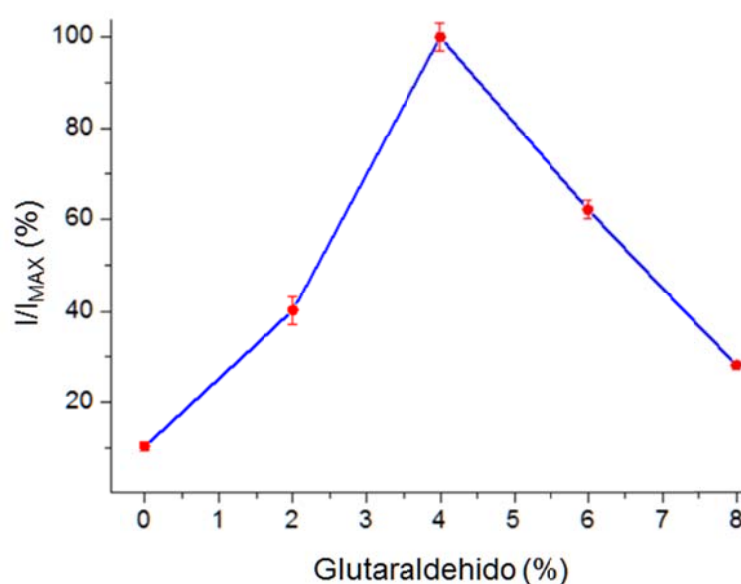


Figura 8.34. Influencia de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0 . $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

La influencia de la cantidad de glutaraldehído sobre la respuesta amperométrica del electrodo enzimático se muestra en la **Figura 8.34**. La respuesta analítica del electrodo aumentó inicialmente con el aumento de la concentración de glutaraldehído empleada, hasta un valor máximo de 4% (v/v). Por el contrario, se apreció una notable disminución en la respuesta analítica de los electrodos preparados con concentraciones mayores de

8. RESULTADOS Y DISCUSION

glutaraldehído, lo cual puede estar asociado a la inactivación progresiva de las moléculas de tirosinasa al ser sometidas a altas concentraciones de agente entrecruzante. De acuerdo a los resultados obtenidos, se empleó una concentración de glutaraldehído de 4% (v/v) como valor óptimo para inmovilizar la enzima sobre las superficies electródicas en estudios posteriores.

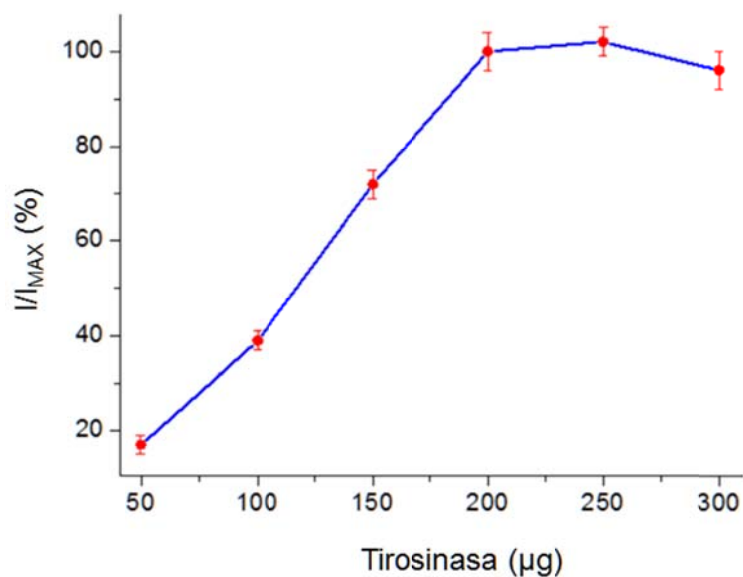


Figura 8.35. Influencia de la cantidad de tirosinasa sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

En la Figura **Figura 8.35** se muestra la influencia de la cantidad de enzima inmovilizada sobre la superficie de los electrodos, sobre la respuesta analítica normalizada de éstos frente a disoluciones de catecol 2 nM. La respuesta analítica se incrementó con el aumento de la cantidad de enzima inmovilizada, obteniéndose un valor máximo para los electrodos preparados con 200 μg de tirosinasa. Como se puede observar, el empleo de mayores cantidades de enzima no mejoró la respuesta analítica de los electrodos, por lo cual este valor optimizado de 200 μg de enzima fue utilizado para la construcción de los electrodos posteriores.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.2.3.2. Caracterización del electrodo enzimático.

Al igual que en el trabajo anterior, se empleó la espectroscopia de impedancia electroquímica como técnica analítica para estudiar las distintas etapas del proceso de ensamblaje del electrodo enzimático. En estos estudios se utilizó una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. En la **Figura 8.36** se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos en estas mediciones. Los datos experimentales obtenidos en este estudio fueron ajustados a un modelo de circuito equivalente de Randles, en aras de facilitar su correcta interpretación.

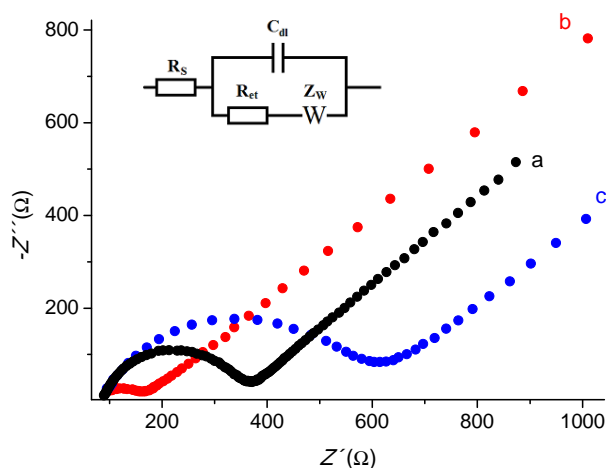


Figura 8.36. Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el nanohíbrido de óxido de grafeno reducido y decorado con nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano (b) y la enzima (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM (1:1). Gráfico insertado: Circuito equivalente de Randles.

El electrodo no modificado mostró una baja resistencia a los procesos de transferencia de carga interfaciales, con un valor de $R_{TC} = 253 \Omega$ (curva a). El recubrimiento del electrodo con el nanomaterial híbrido (curva b) provocó una notable disminución en la resistencia de los procesos de transferencia de carga interfaciales ($R_{TC} = 64 \Omega$), lo cual se vislumbra a partir

8. RESULTADOS Y DISCUSION

de la reducción del diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist con respecto al electrodo sin modificar. Este hecho confirma las altas propiedades electroconductoras del nanomaterial híbrido preparado. El diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist correspondiente al espectro de impedancia electroquímica del electrodo nanoestructurado aumentó considerablemente más tras la inmovilización covalente de la enzima (curva c). Esta variación implica un aumento en la resistencia de los procesos de transferencia de carga en esta superficie electródica, con un valor de $R_{TC} = 471 \Omega$, el cual es 7.35 veces superior al del electrodo modificado con el nanohíbrido. Este hecho confirma la presencia de la tirosinasa sobre la superficie del electrodo, y se justifica por las propiedades no conductoras de las moléculas de esta proteína. Por otra parte, el gran aumento observado para la R_{TC} de la superficie electródica tras la inmovilización de la tirosinasa sugiere una alta densidad de moléculas de enzima distribuidas sobre la superficie nanoestructurada del electrodo, y demuestra la eficiencia del método de inmovilización enzimática empleado en el ensamblaje de este electrodo.

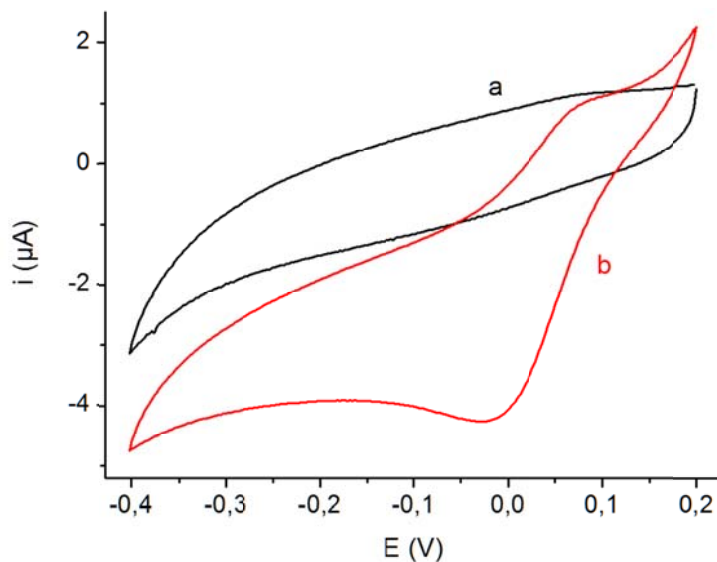


Figura 8.37. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de tirosinasa inmovilizada sobre carbono vitrificado recubierto con el nanohíbrido de óxido de grafeno en ausencia (a) y presencia (b) de catecol 10 nM.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

La capacidad electroanalítica del electrodo enzimático preparado fue evaluada mediante voltamperometría cíclica, empleando catecol como analito modelo. Los resultados de estos análisis se muestran en la **Figura 8.37**.

El voltamperograma realizado a la solución reguladora con el electrodo enzimático no mostró picos definidos, lo cual sugiere la ausencia de procesos redox en este sistema, bajo las condiciones en estudio. Por el contrario, el voltamperograma adquirido con el electrodo enzimático ensamblado, en solución de catecol 10 nM, mostró un pequeño pico de oxidación a 75 mV, así como un intenso pico de reducción a -29 mV. Estas señales voltamperométricas se corresponden con el sistema cuasi-reversible de catecol/*o*-benzoquinona. Asimismo, el alto valor de corriente catódica mostrada por el pico a -29 mV, correspondiente a la reducción de la *o*-benzoquinona producida mediante la transformación del catecol sobre la superficie electródica, permite inferir una alta actividad electrocatalítica del electrodo enzimático preparado. Sobre esta base, el electrodo nanoestructurado de tirosinasa preparado fue empleado en la construcción de un biosensor enzimático para la determinación electroanalítica de catecol.

8.2.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida.

Las condiciones óptimas de trabajo a emplear fueron determinadas midiendo la señal analítica obtenida con el biosensor mediante amperometría en disoluciones agitadas tras la adición de catecol (concentración final en celda: 2 nM). Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

En la **Figura 8.38** se muestra la influencia del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre -0.2 V y 0.1 V vs Ag/AgCl, sobre los valores de la señal amperométrica normalizada obtenida frente a catecol 2 nM, en una disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. Como puede apreciarse, los mayores valores de señal analítica fueron

8. RESULTADOS Y DISCUSION

obtenidos en los experimentos donde se aplicó un potencial de trabajo de -0.10 V, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

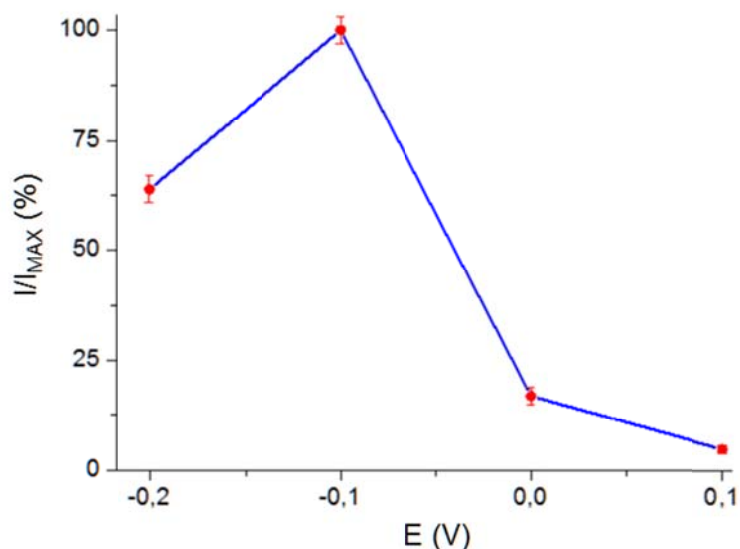


Figura 8.38. *Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0.*

En la **Figura 8.39** se muestra el perfil de respuesta amperométrica de los electrodos enzimáticos frente a catecol 2 nM, en función del pH de la solución de medida. Estos experimentos fueron realizando utilizando como potencial de trabajo -0.10 V vs Ag/AgCl, y empleando disoluciones reguladoras de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH, dentro del intervalo de 5.0 a 8.0.

Los mayores valores de respuesta analítica se obtuvieron en los experimentos donde la medición se realizó a pH 7.0, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

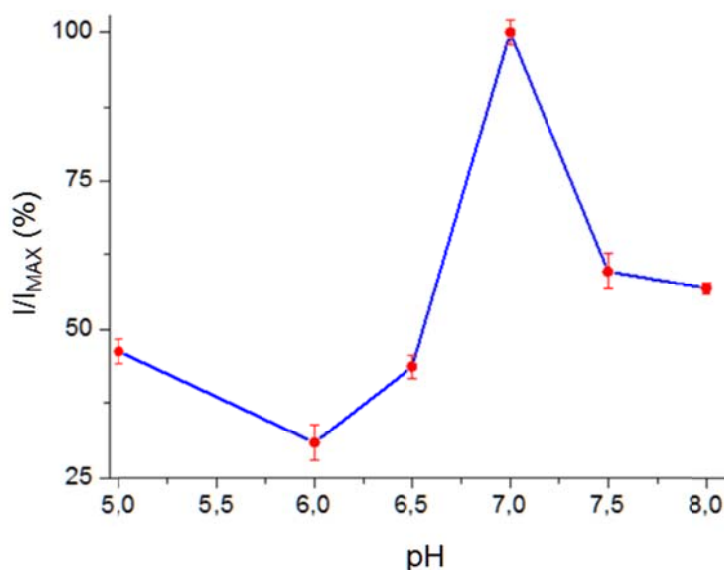


Figura 8.39. Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando catecol 2 nM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{apl} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

8.2.4. Características analíticas del biosensor.

8.2.4.1. Especificidad del biosensor.

El electrodo enzimático preparado fue empleado en la construcción de un biosensor amperométrico para catecol. Para ello se emplearon las condiciones experimentales de medida optimizadas, realizando las mediciones amperométricas en agitadas.

Inicialmente, se comprobó la capacidad del biosensor para cuantificar distintos tipos de compuestos fenólicos, evaluando su respuesta analítica frente a disoluciones de concentración 2 nM de distintos analitos de este tipo. El biosensor preparado mostró una alta especificidad frente al catecol, no mostrando señal analítica frente a disoluciones de bisfenol A, 4-*terc*-butilfenol, 17- β -estradiol, y 17- α -etinilestradiol. Frente a la hidroquinona, el biosensor mostró una pequeña respuesta amperométrica, la cual representó menos del

8. RESULTADOS Y DISCUSION

20% de la señal obtenida para catecol. Estos resultados concuerdan con las características de especificidad de la tirosinasa de hongos empleada, la cual ha sido clasificada como una catecol oxidasa [Espín *et al.*, 2000].

8.2.4.2. Curva de calibración y rango lineal.

En la **Figura 8.40** se representa la variación de la corriente medida con el biosensor enzimático tras sucesivas adiciones de catecol. El biosensor de tirosinasa mostró una respuesta rápida tras la adición del analito, obteniéndose el 95% de la corriente en el estado estacionario solo 5 segundos después de la adición de catecol.

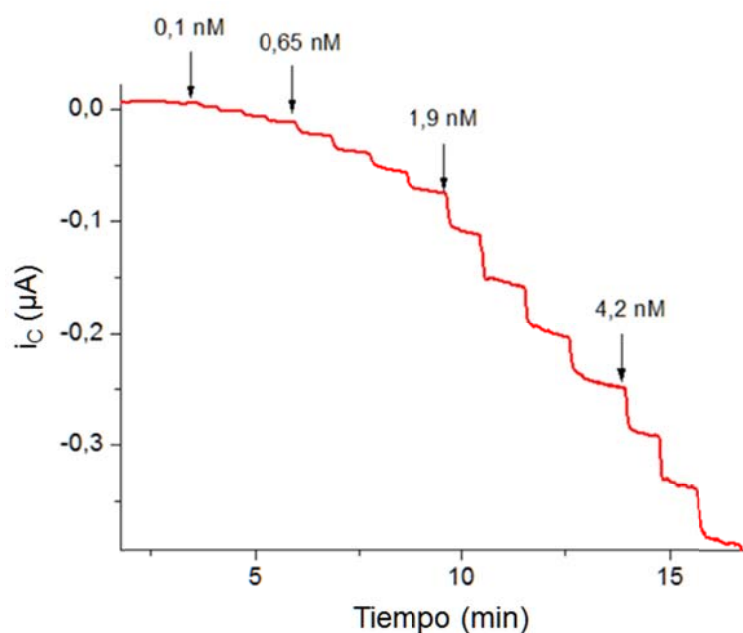


Figura 8.40. Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/Ag/Cl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de intensidad de corriente vs concentración de catecol obtenidos en estos experimentos fueron empleados para la construcción de la curva de calibración del biosensor. La curva promedio resultante de estos estudios se muestra en la **Figura 8.41**.

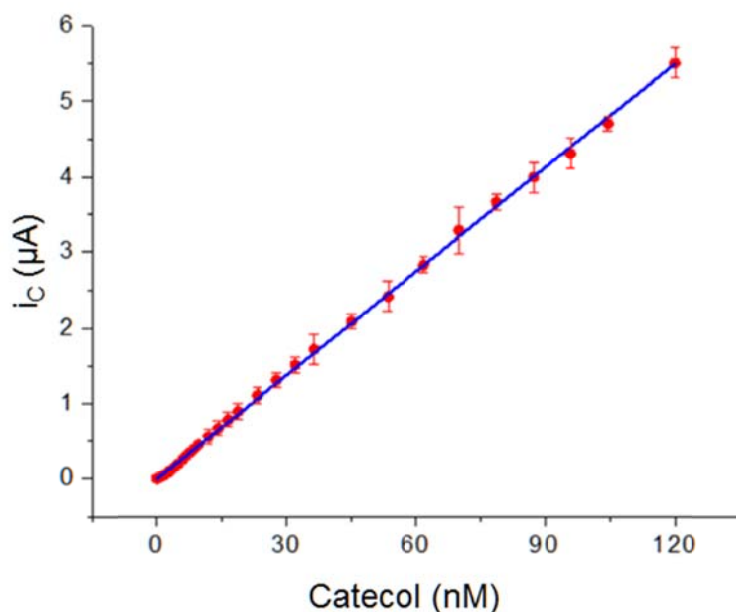


Figura 8.41. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de catecol empleando el biosensor enzimático de tirosinasa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/Ag/Cl.

El biosensor enzimático presentó un comportamiento lineal de la respuesta amperométrica frente a catecol en el intervalo de concentraciones comprendido entre 100 pM y 120 nM. Este comportamiento se ajustó a la siguiente ecuación, con un coeficiente de correlación de 0.9995 ($n = 10$):

$$i_c, \text{ A} = 45.9 \times [\text{catechol}], \text{ M} - 6.0 \times 10^{-9}$$

Este resultado es muy significativo, pues demuestra que el biosensor preparado es capaz de detectar catecol a muy bajas concentraciones. Por otra parte, el corto rango de intervalo lineal mostrado por el biosensor, de solo 3 órdenes de magnitud, puede estar condicionado por la alta sensibilidad mostrada por el dispositivo, en concordancia con el

8. RESULTADOS Y DISCUSION

comportamiento general descrito previamente en la bibliografía para sistemas sensores y biosensores electroquímicos [Raof *et al.*, 2011; Ghica y Brett, 2013].

8.2.4.3. Sensibilidad del biosensor.

La sensibilidad del biosensor hacia el catecol se determinó como la pendiente del calibrado entre el área electroactiva del electrodo, la cual fue determinada igual a 14.1 mm^2 mediante voltametría cíclica usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox, y empleando el modelo de Randles-Sevcik para su cálculo. El valor de sensibilidad obtenido fue de $652 \text{ A/M}\cdot\text{cm}^2$, por lo que podemos afirmar que nuestro biosensor posee una muy alta sensibilidad.

Como muchos autores describen como valor de sensibilidad la pendiente de la curva de calibración, independientemente del valor de área electroactiva del electrodo, en este caso también describimos como valor de sensibilidad 45.9 A/M , en aras de facilitar la comparación de nuestros resultados con otros descritos en la literatura. En general, la sensibilidad mostrada por el biosensor construido fue mucho mayor que la descrita para otros dispositivos similares basados en la enzima tirosinasa, tal como se muestra en la **Tabla**

8.3.

8.2.4.4. Límite de detección del biosensor.

El límite de detección se calculó de acuerdo con el criterio $3\cdot\text{SD}/m$, siendo m la pendiente del intervalo lineal del calibrado y SD la desviación estándar de las señales de intensidad de corriente obtenidas para 10 adiciones de patrón de catecol de concentración igual a la más baja medida en el calibrado.

El límite de detección estimado para este biosensor fue de 40 pM ($n=10$), el cual fue mucho menor que el descrito para otros biosensores de tirosinasa. En aras de facilitar la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

comparación de las propiedades analíticas del biosensor preparado con otros previamente descritos en la literatura, en la **Tabla 8.3** se muestran los valores de rango de respuesta lineal, sensibilidad y límite de detección de estos dispositivos electroanalíticos.

Tabla 8.3. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de tirosinasa para catecol.

Electrodo	Rango Lineal (M)	Sensibilidad (mA·M ⁻¹ / A·M ⁻¹ ·cm ⁻²)	LD (M)	Referencia
Tir-Au/PBA-GO/SPE	$8.3 \times 10^{-8} - 2.3 \times 10^{-5}$	160 / 5.16	2.4×10^{-8}	[Song <i>et al.</i> , 2011]
Tir-GR-SP/ GCE	$1 \times 10^{-9} - 1.7 \times 10^{-5}$	-	2.3×10^{-10}	[Qu <i>et al.</i> , 2013b]
Tir/TNT/GNPs/GCE	$3 \times 10^{-7} - 1.1 \times 10^{-4}$	150 / 2.14	5.5×10^{-8}	[Liu <i>et al.</i> , 2015]
Tir/GR-CS/GCE	$1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-4}$	69 / 0.99	7.5×10^{-7}	[Yin <i>et al.</i> , 2011]
Tir/PAMAM- rGO/GCE	$1 \times 10^{-8} - 2.2 \times 10^{-5}$	424 / 6.06	6×10^{-9}	[Araque <i>et al.</i> , 2013]
Tir/rGO/SPE	$2 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-5}$	89.8 / -	1×10^{-11}	[Baptista-Pires <i>et al.</i> , 2014]
Tir/CMC-rGO/GCE	$2 \times 10^{-6} - 5.6 \times 10^{-5}$	270 / 3.86	2×10^{-10}	[Araque <i>et al.</i> , 2014a]
Tir/Dex-Au-rGO/GCE	$1 \times 10^{-10} - 1.2 \times 10^{-7}$	45900 / 656	4×10^{-11}	Presente trabajo

Tir: tirosinasa; **Au:** nanopartículas de Au; **PBA:** ácido 1-pirenobutanoico; **GO:** óxido de grafeno; **SPE:** electrodos serigrafiados de carbono; **GR:** grafeno; **SP:** péptido de la proteína de la seda; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **TNT:** nanotubos de TiO₂; **GNPs:** nanoplatos de grafeno; **CS:** quitosano; **PAMAM:** dendrímero de poliamidoamina G-4; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **CMC:** carboximetilcelulosa; **Dex:** dextrano.

8.2.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático.

Las constantes cinéticas aparentes $K_{M(ap)}$ e $I_{MAX(ap)}$ fueron determinadas empleando el método gráfico de Lineweaver-Burk, mediante la representación del inverso de la intensidad de corriente en el estado estacionario para las señales obtenidas frente al inverso de la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

concentración de catecol. Los valores calculados para estos parámetros cinéticos fueron $K_{M(ap)} = 5.7 \mu\text{M}$ e $I_{MAX(ap)} = 26.0 \mu\text{A}$ ($372 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

Debe destacarse que la constante aparente de Michaelis determinada para la enzima inmovilizada en la superficie del biosensor fue 42 veces menor que la descrita para la enzima en disolución ($240 \mu\text{M}$) [Smith y Krueger, 1962]. Este hecho permite sugerir que el proceso de inmovilización aumentó la afinidad de la enzima por el sustrato catecol, o que disminuyó el valor efectivo de la V_{MAX} (k_{cat}).

8.2.4.6. Repetitividad de las medidas.

Para estudiar la repetitividad entre medidas, se determinó la señal analítica del biosensor frente a 10 adiciones de catecol, que generaron una concentración final en la celda electroquímica de 10 nM . Para estos experimentos se empleó un único biosensor enzimático. Tomando en consideración el valor medio y la desviación estándar de los valores obtenidos para estas mediciones electroanalíticas, se obtuvo un valor de R.S.D. de 5.8%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena repetitividad de las medidas llevadas a cabo con el biosensor.

8.2.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

La reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor fue determinada a partir de la respuesta amperométrica de 10 biosensores fabricados de la misma manera, frente a disoluciones de catecol de concentración 10 nM . La RSD calculada para estas mediciones fue de 8.1%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena reproducibilidad del proceso de construcción del biosensor enzimático.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.2.4.8. Interferencias.

Para este estudio se seleccionaron 5 compuestos químicos con potencial efecto interferente sobre la medida del biosensor: bisfenol A, hidroquinona, 4-*terc*-butilfenol, 17- β -estradiol y 17- α -etinilestradiol. Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de catecol de concentración 2.5 nM, en ausencia y presencia de concentraciones 10 veces mayores de los potenciales compuestos interferentes.

Como resultado de estos experimentos se observó que solo la hidroquinona poseía efecto interferente sobre el biosensor, afectando en un 24% la medida amperométrica bajo las condiciones de trabajo antes descritas. Este hecho nos permite concluir que este compuesto es una sustancia interferente a tener en cuenta en análisis a realizar con este biosensor enzimático.

8.2.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor.

Para determinar la estabilidad de almacenamiento del biosensor enzimático, se prepararon 5 electrodos según el protocolo propuesto. Estos electrodos fueron almacenados a 4 °C y en oscuridad, en condiciones de sequedad, y fueron periódicamente evaluados mediante la determinación de su respuesta amperométrica frente a catecol 2 nM.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

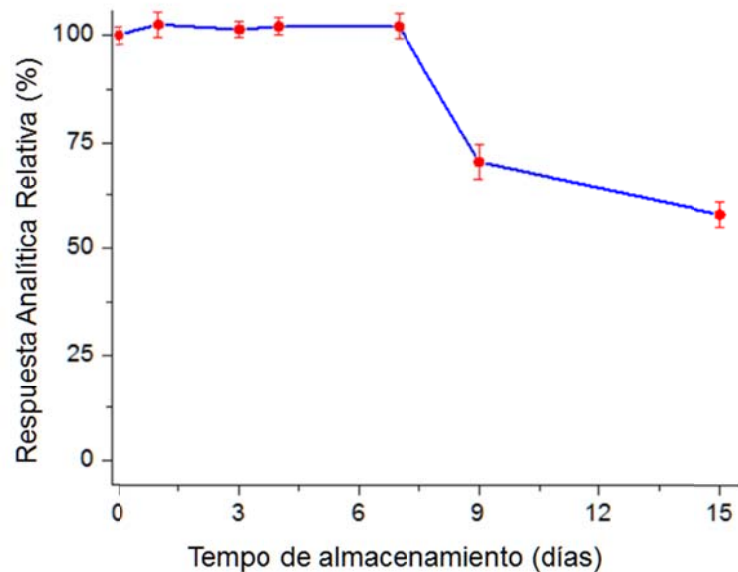


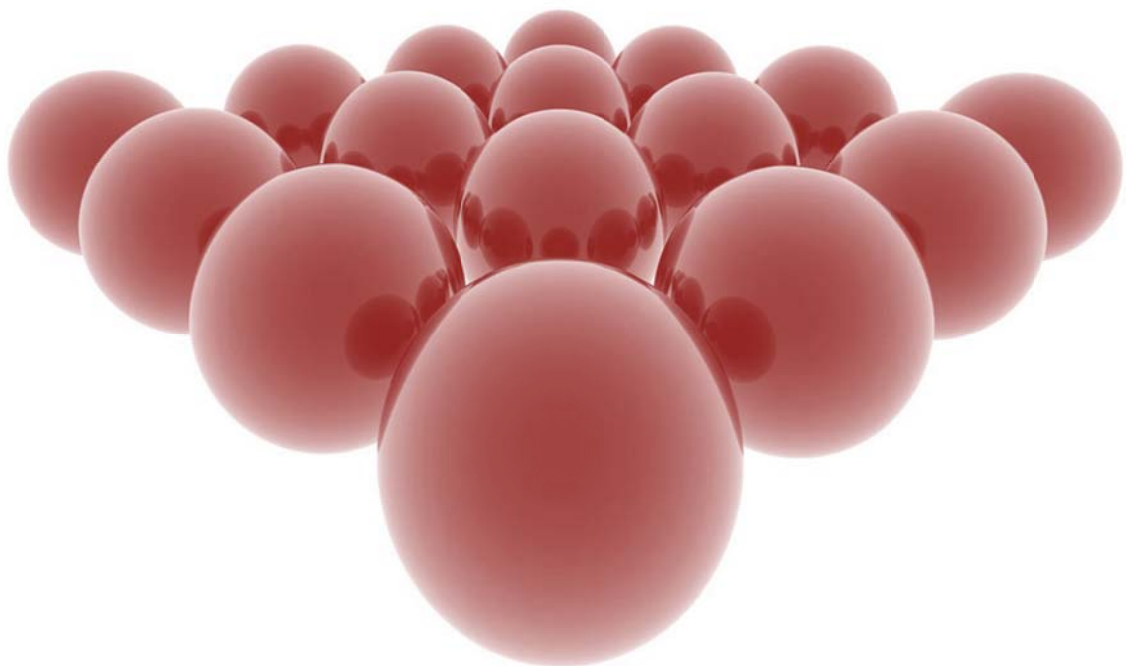
Figura 8.42. *Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.*

En la **Figura 8.42** se muestra la influencia del tiempo de incubación sobre la respuesta analítica normalizada de estos biosensores. El biosensor enzimático mostró una excelente estabilidad a lo largo del tiempo, reteniendo el 100% de la actividad inicial después de 7 días de almacenaje. A mayores tiempos de conservación se apreció una disminución de la capacidad analítica del biosensor, reteniendo aproximadamente el 58% de la actividad inicial tras 15 días de almacenamiento.

Parte II: Biosensores basados en híbridos de nanopartículas

8.3

Biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple



8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.3. Biosensor amperométrico para D-glucosa basado en nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa y electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared simple.

8.3.1. Preparación de las nanopartículas Janus.

En el presente trabajo se evaluó por primera vez el uso de nanopartículas Janus para la construcción de un biosensor electroquímico. Para ello se emplearon nanopartículas Janus de oro y sílice mesoporosa, previamente desarrolladas en el grupo de investigación [Villalonga *et al.*, 2013; Díez *et al.*, 2014]. Esta propuesta se basa en las características estructurales de estos nuevos nanomateriales anisotrópicos, que permiten la funcionalización toposelectiva de cada una de las nanopartículas constituyentes mediante el empleo de métodos de funcionalización superficial diferentes.

Para el desarrollo de este trabajo se tomó como modelo el par enzimático D-glucosa oxidasa/peroxidasa, ampliamente empleado en la construcción de biosensores bienzimáticos para la determinación de este monosacárido [Xu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2016].

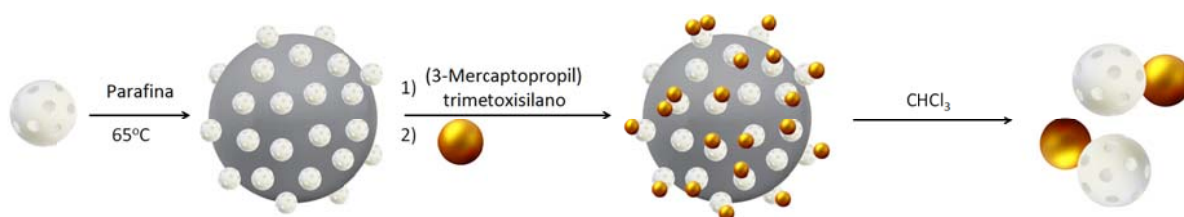


Figura 8.43. Representación esquemática del proceso de preparación de las nanopartículas Janus de Au y sílice mesoporosa.

En la **Figura 8.43** se muestra el procedimiento empleado para la preparación de las nanopartículas Janus. Para ello, se prepararon inicialmente nanopartículas de sílice mesoporosas de tamaño promedio (97 ± 15) nm, mediante hidrólisis alcalina de

8. RESULTADOS Y DISCUSION

tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico, en presencia del surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio como agente porogénico. En la Figura **Figura 8.4A** se muestra una imagen representativa de estas nanopartículas, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.

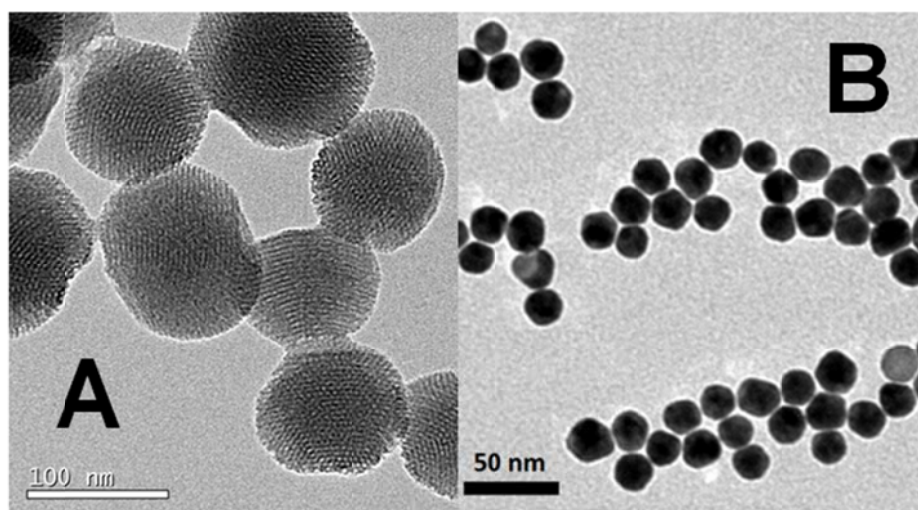


Figura 8.44. *Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de sílice mesoporosa (A) y Au (B).*

Para el ensamblaje de las nanopartículas Janus se empleó una estrategia combinada de enmascaramiento y modificación superficial toposelectiva de las nanopartículas de sílice mesoporosas [Villalonga *et al.*, 2013; Díez *et al.*, 2014]. Para ello se preparó una emulsión tipo Pickering con parafina y las nanopartículas inorgánicas, donde los coloidosomas en la emulsión fueron estabilizados mediante adsorción parcial de las nanopartículas de sílice mesoporosa sobre su superficie. Mediante este procedimiento se logra enmascarar parte de la superficie de las nanopartículas de sílice dentro de la parafina. Posteriormente, la zona expuesta de estas nanopartículas es selectivamente modificada con (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, con el objetivo de funcionalizar esta superficie con grupos tioles. Estos grupos tioles fueron posteriormente empleados como centros de anclaje para la unión de nanopartículas de oro de 20 ± 2 nm, las cuales fueron preparadas mediante reducción de HAuCl_4 con citrato de sodio [Frens, 1973]. En la Figura **Figura 8.4B** se muestra

8. RESULTADOS Y DISCUSION

una imagen representativa de estas nanopartículas, obtenida mediante microscopia electrónica de transmisión.

El tratamiento posterior de los coloidosomas con CHCl_3 disuelve la parafina y libera las nanopartículas Janus de Au y sílice mesoporosa.

8.3.2. Caracterización de las nanopartículas Janus.

Las nanopartículas anisotrópicas preparadas fueron caracterizadas mediante diferentes técnicas, tales como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, espectroscopia UV-Visible, difracción de rayos X, análisis termogravimétrico, y microscopía electrónica de transmisión. Adicionalmente, características como el área superficial específica y la morfología del poro de las nanopartículas fueron determinadas mediante isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno.

8.3.2.1. Caracterización mediante espectroscopia FT-IR.

En la **Figura 8.45** se muestran los espectros FT-IR de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de Au-sílice mesoporosa (b). Ambos espectros muestran bandas características de los materiales silíceos, tales como la banda a 803 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de los tetraedros de SiO_4 , la banda a 946 cm^{-1} que se debe a la existencia de grupos Si-OH, la banda intensa a 1080 cm^{-1} , que se atribuye a las vibraciones de los grupos Si-O-Si, y la banda ancha centrada a 3450 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de los grupos Si-OH y de las moléculas de agua adsorbidas en el material.

Sin embargo, mediante esta técnica no pudo determinarse la presencia de las nanopartículas de oro y los residuos de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano en las nanopartículas Janus.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

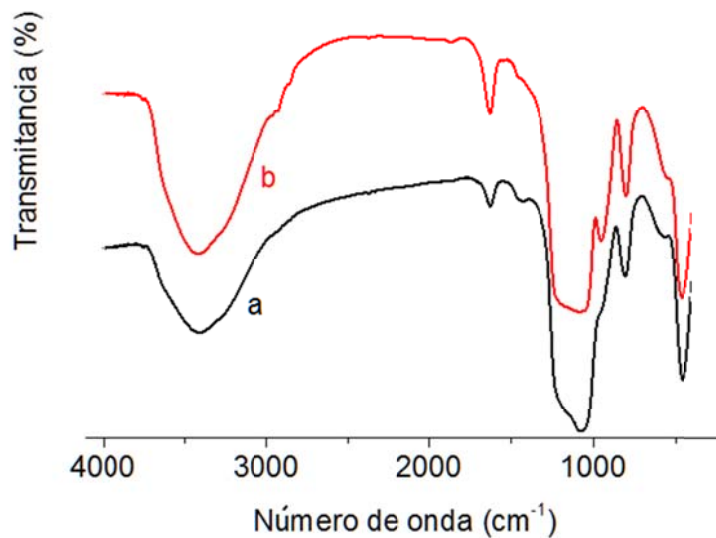


Figura 8.45. Espectros FT-IR de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).

8.3.2.2. Caracterización las nanopartículas Janus mediante espectroscopia UV-visible.

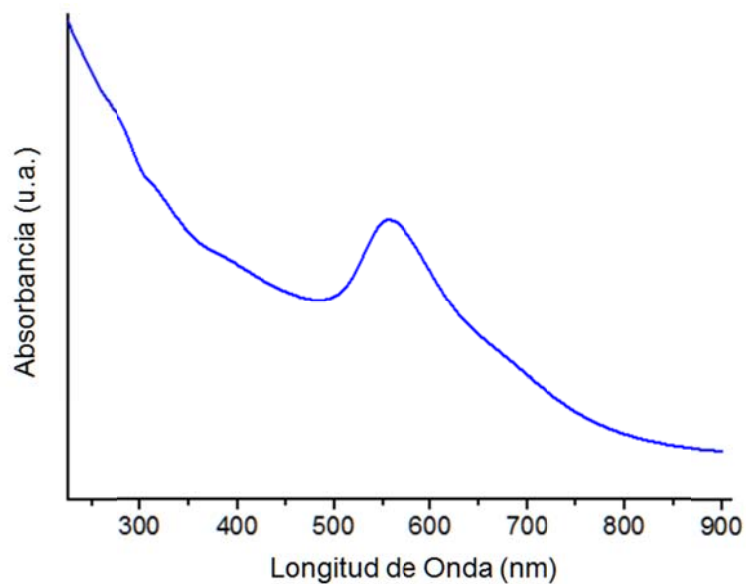


Figura 8.46. Espectro UV-Visible de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En la **Figura 8.46** se muestra el espectro UV-Visible de las nanopartículas Janus. En este espectro se observa claramente una banda intensa a 556 nm, característica del plasmón superficial de las nanopartículas de oro, lo cual confirma la presencia de éstas en las nanopartículas Janus.

8.3.2.3. Caracterización las nanopartículas Janus mediante termogravimetría.

En la **Figura 8.47** se muestran los termogramas obtenidos en los experimentos de caracterización de los nanomateriales mesoporosos preparados.

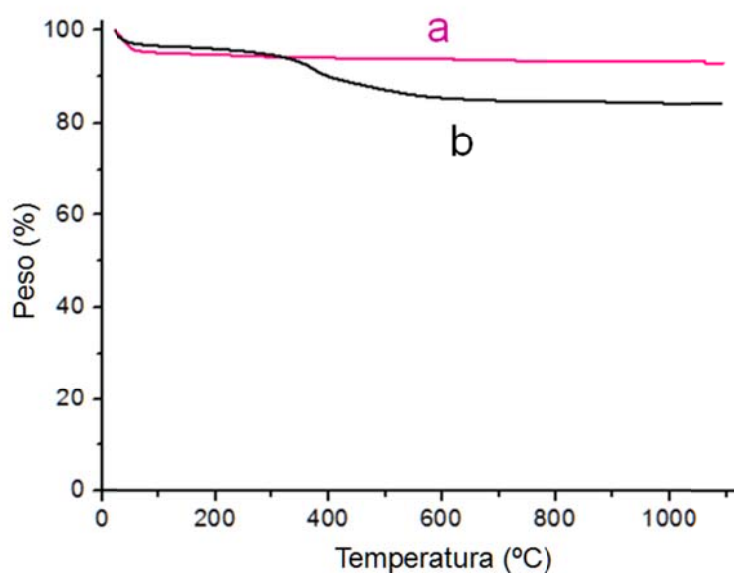


Figura 8.47. Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).

Todos los nanomateriales analizados mostraron una pérdida de masa en el rango de temperaturas entre 25°C-110°C, debido a la desorción térmica de las moléculas de agua adsorbidas en estos productos. Las nanopartículas Janus mostraron una segunda etapa de descomposición térmica, con máxima velocidad de descomposición a 442°C en la cual se perdió el 10.1% del peso seco de la muestra. Esta pérdida de peso puede estar asociada a la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

degradación de los grupos (3-mercaptopropil)trimetoxisilano que unen ambas nanopartículas, o más lógicamente, a la descomposición térmica de las moléculas de citrato de sodio adsorbidas sobre la superficie coloidal de las nanopartículas de oro.

8.3.2.4. Caracterización mediante difracción de rayos X.

Las nanopartículas Janus fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X en polvo, obteniéndose los difractogramas mostrados en la **Figura 8.48**.

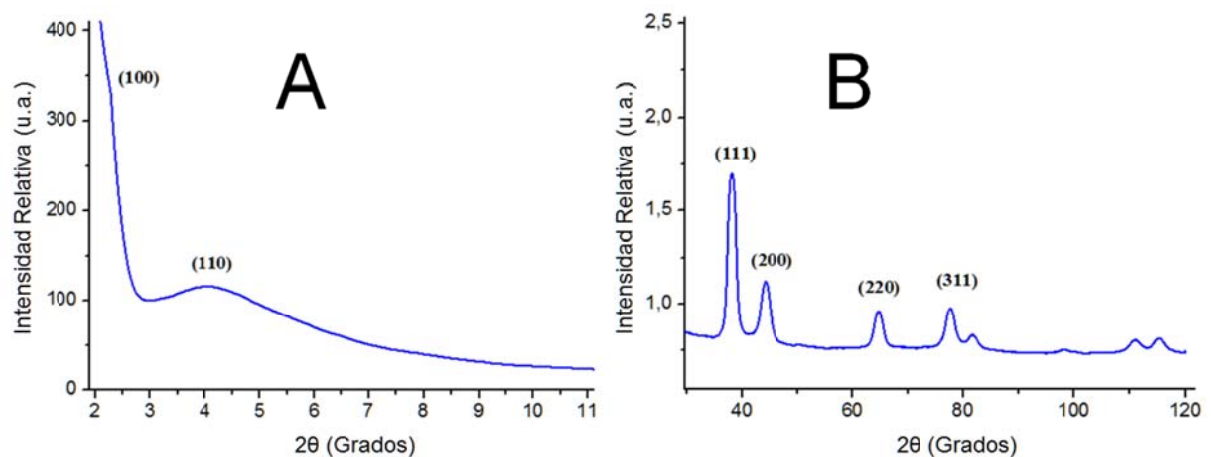


Figura 8.48. Análisis mediante difracción de rayos X, a ángulos bajos (A) y altos (B), de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.

En el difractograma de la muestra a ángulos bajos se pueden observar dos picos típicos del ordenamiento hexagonal existente en materiales mesoporosos de tipo MCM-41 [Jesus *et al.*, 2016]. Dichos picos se corresponden a los planos (100) y (110) de reflexión de Bragg. Por otra parte, a valores de ángulo superiores se pudo observar la presencia de los picos de difracción característicos de las fases (111), (200), (220) y (311) del oro [Uppal *et al.*, 2013], confirmando la presencia de nanocristales de este metal en las nanopartículas Janus.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.3.2.5. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión.

En la **Figura 8.49** se muestran imágenes características de las nanopartículas anisotrópicas preparadas, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión.

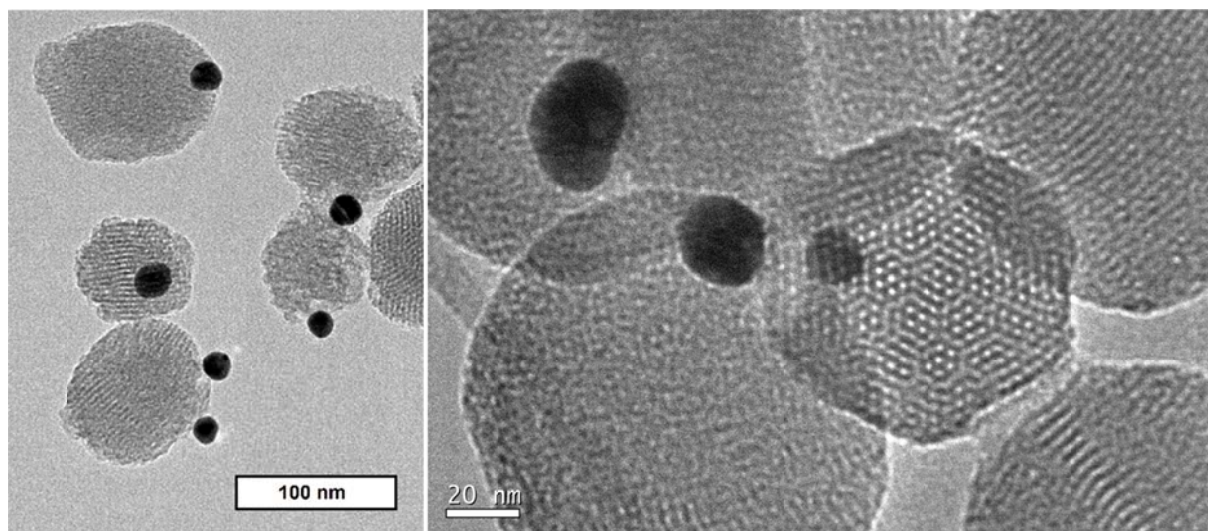


Figura 8.49. *Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa.*

A partir de estos análisis se comprobó la presencia de las nanopartículas de oro unidas a las nanopartículas de sílice, en proporción mayoritaria 1:1. No obstante, se pudo apreciar la presencia de nanopartículas con mayor contenido de oro, fundamentalmente en proporciones 2:1 y 3:1. Asimismo, se comprobó la estructura mesoporosa de las nanopartículas de sílice, las cuales mostraron un patrón de distribución hexagonal de los poros, característico de los materiales mesoporosos de tipo MCM-41 [Lai *et al.*, 2010].

8.3.2.6. Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno.

Los nanomateriales mesoporosos preparados fueron caracterizados mediante la determinación de sus correspondientes isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno. Debe destacarse que las isotermas correspondientes a materiales porosos se caracterizan

8. RESULTADOS Y DISCUSION

por la presencia de un ciclo de histéresis, es decir, las curvas de adsorción y desorción difieren debido a fenómenos de condensación capilar.

En la **Figura 8.50** se muestran las isothermas obtenidas para las nanopartículas de sílice mesoporosa y Janus de Au-sílice mesoporosa. Las isothermas de ambas nanopartículas mostraron dos escalones de adsorción pronunciados. El primero, a un valor de P/P_0 intermedio (0.2-0.4), se debe a la condensación de las moléculas de nitrógeno en el interior de los mesoporos, debido a procesos de capilaridad. La ausencia de un ciclo de histéresis en este intervalo implica la existencia de mesoporos fácilmente accesibles.

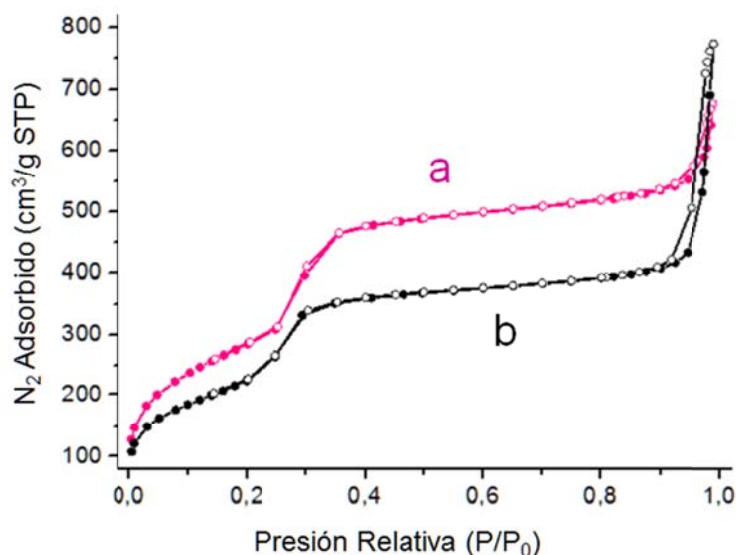


Figura 8.50. Isothermas de adsorción (círculos cerrados) y desorción (círculos abiertos) de N_2 de las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).

El segundo escalón aparece a valores elevados de P/P_0 (por encima de 0.8), lo que corresponde al llenado de los grandes huecos existentes entre las partículas. El pequeño ciclo de histéresis observado a altos valores de presión relativa para las nanopartículas Janus sugiere que algunos poros han sido bloqueados parcialmente, probablemente debido a la unión de las nanopartículas de oro a la superficie mesoporosa de las nanopartículas de sílice.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis de estos datos experimentales se realizó mediante la aplicación del modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET) [Brunauer *et al.*, 1938; Agarwal *et al.*, 2016]. Estos análisis proporcionaron un valor de 1037 m²/g para la superficie específica total de las nanopartículas de sílice mesoporosa, y de 819 m²/g para las nanopartículas Janus.

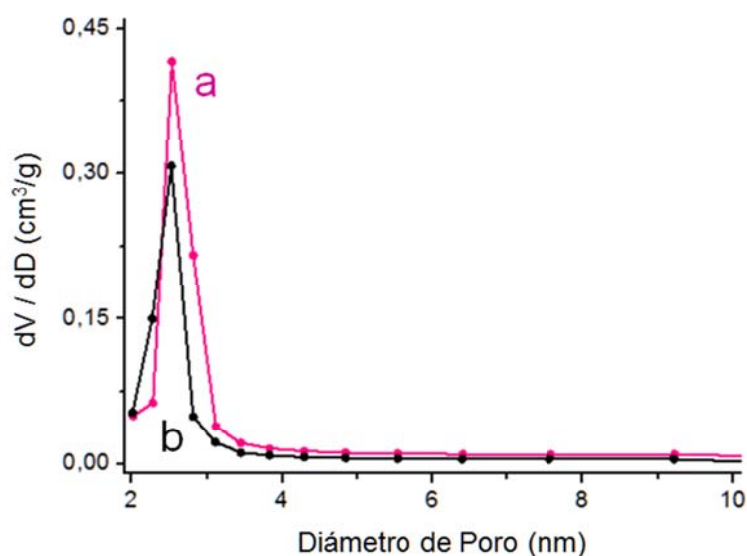


Figura 8.51. Distribución del tamaño de poro para las nanopartículas de sílice mesoporosa (a) y Janus de oro-sílice mesoporosa (b).

Por otra parte, la distribución del tamaño de poro para estos materiales fue determinada mediante la aplicación del modelo de isoterma de Barrett, Joyner y Halenda (BJH) [Barrett *et al.*, 1951; Shen *et al.*, 2011] (Figura 8.51). A partir de este análisis se determinó que ambos nanomateriales presentaron un tamaño medio de poro de (2 ± 0.3) nm.

8.3.3. Ensamblaje del electrodo bienzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa.

Las nanopartículas Janus preparadas fueron empleadas como soporte para la co-inmovilización covalente y toposelectiva de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa. En la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Figura 8.52 se representa la estrategia empleada para la biofuncionalización de las nanopartículas Janus con estas enzimas.

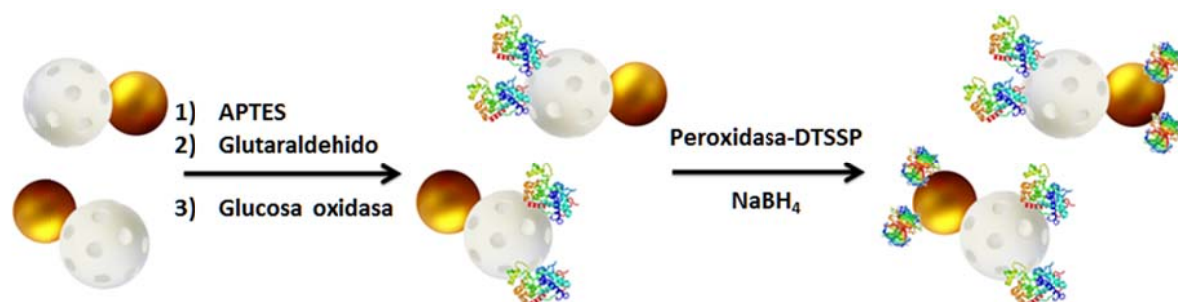


Figura 8.52. Representación esquemática del proceso de biofuncionalización toposelectiva de las nanopartículas Janus con las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa.

Las nanopartículas Janus fueron inicialmente modificadas con (3-aminopropil)-trimetoxisilano (APTES) con el objetivo de introducir grupos amino primarios en la cara de sílice mesoporosa. Estos grupos amino primarios fueron tratados con glutaraldehído, con el objetivo de introducir grupos aldehído reactivos, los cuales sirvieron de punto de anclaje para la posterior inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa en la cara mesoporosa de la nanopartícula.

Posteriormente se funcionalizó la cara de oro de la nanopartícula Janus mediante inmovilización de la enzima peroxidasa, la cual fue previamente tratada con 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP) con el objetivo de introducir grupos tioles reactivos sobre la superficie expuesta de la cadena polipeptídica de la enzima. Las nanopartículas bifuncionalizadas con glucosa oxidasa y peroxidasa (GOx-HRP-JNP) se mantuvieron a 4°C en solución de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.0, hasta su uso.

Con el objetivo de asegurar una alta densidad de moléculas inmovilizadas sobre la superficie de las nanopartículas, en este protocolo de co-inmovilización se empleó una alta relación de enzimas/nanopartículas Janus igual a 60 mg/g. La cantidad de glucosa oxidasa y

8. RESULTADOS Y DISCUSION

peroxidasa inmovilizada bajo estas condiciones fue de 3.1 U y 2.2 U por miligramo de nanopartículas, respectivamente. Esta cuantificación fue realizada mediante la determinación espectrofotométrica de la actividad de cada enzima [Jiang y Penner, 2015].

Debe destacarse que las enzimas inmovilizadas retuvieron toda su actividad enzimática tras un mes de almacenamiento a 4°C en solución de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, lo cual demuestra que las nanopartículas Janus son un soporte excelente para la inmovilización covalente de estas enzimas redox.

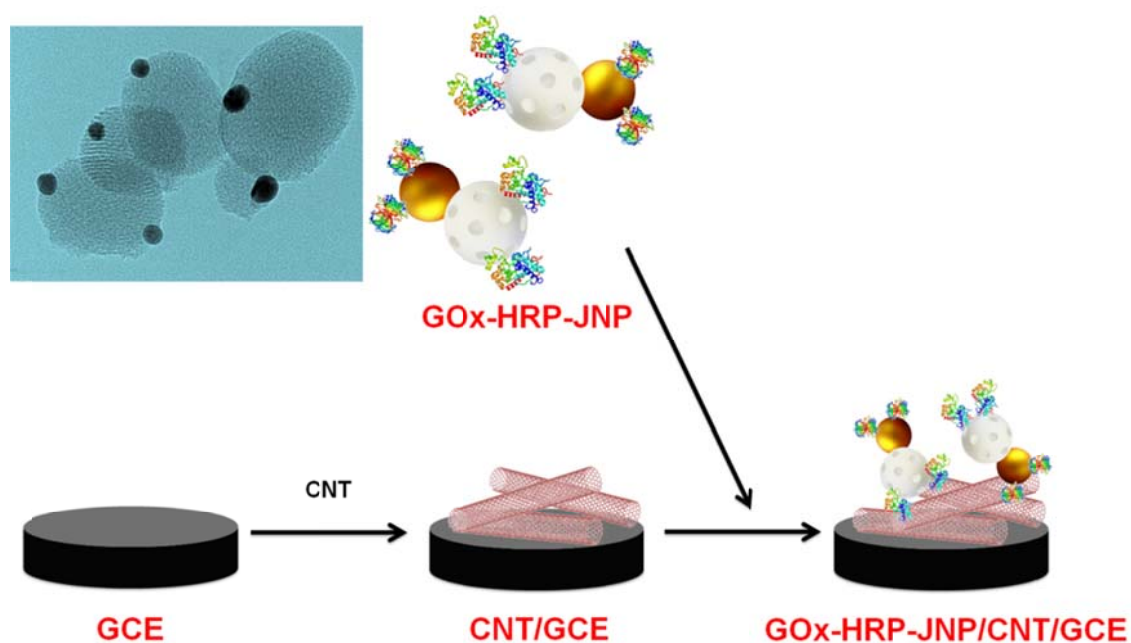


Figura 8.53. Representación esquemática del proceso de ensamblaje del biosensor bienzimático para la detección de D-glucosa.

Como experimento control se preparó un nanocatalizador bienzimático en el cual se co-inmovilizó toposelectivamente la peroxidasa y la glucosa oxidasa en las caras de sílice mesoporosa y Au de las nanopartículas Janus, respectivamente. La actividad glucosa oxidasa detectada en estas nanopartículas fue 3 veces menor que la observada en aquellos nanocatalizadores preparados según el esquema representado en la **Figura 8.52**. Este hecho

8. RESULTADOS Y DISCUSION

experimental confirma que el diseño de co-inmovilización toposelectiva empleado en nuestro trabajo fue el óptimo.

Las nanopartículas Janus bifuncionalizadas con las enzimas se emplearon en el ensamblaje de un biosensor amperométrico para la detección de D-glucosa. Para ello se depositaron sobre electrodos de carbono vitrificado recubiertos con nanotubos de carbono de pared simple activados con grupos carboxilato, como se representa en la **Figura 8.53**. Este diseño de electrodo (GOx-HRP-JNP/CNT/GCE), que incluye nanotubos de carbono de pared simple entre los elementos de transducción, resultó ser muy efectivo, como se demuestra en el Apartado siguiente.

8.3.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje del electrodo.

El primer parámetro a considerar en el diseño del biosensor fue la posibilidad de emplear electrodos de carbono vitrificado modificados con nanotubos de carbono de pared simple como interface de transducción. Para ello se prepararon electrodos con este diseño, así como electrodos control solamente funcionalizados con los nanotubos de carbono o las nanopartículas Janus.

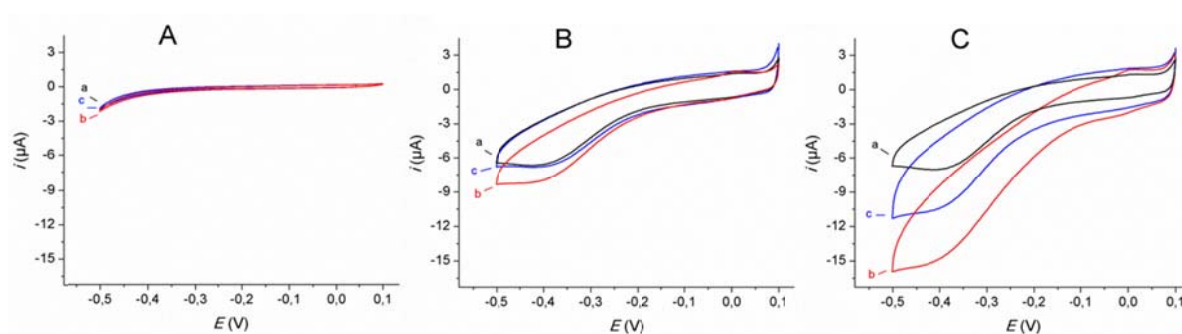


Figura 8.54. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 6.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de carbono vitrificado modificados con GOx-HRP-JNP (A), nanotubos de carbono de pared simple (B) y GOx-HRP-JNP/CNT/GCE (C), en ausencia (a) y presencia de H₂O₂ 3 mM (b) y D-glucosa (c).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

La respuesta analítica de estos electrodos frente a H_2O_2 y D-glucosa fue evaluada mediante voltametría cíclica. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 8.54**.

La modificación de los electrodos con las nanopartículas Janus bifuncionalizadas con las enzimas produjo superficies sensoras que mostraron muy baja corriente de fondo en los experimentos de voltametría cíclica (**Figura 8.54A**, curva a). Este electrodo mostró además una baja respuesta analítica frente a H_2O_2 y D-glucosa (**Figura 8.54A**, curvas b y c), lo cual puede estar asociado a la baja estabilidad mecánica de la interfaz formada por las nanopartículas depositadas sobre la superficie del electrodo, lo cual puede ocasionar el desprendimiento de estas nanoestructuras durante los procesos de ensamblaje y medición.

Como era de esperar, la modificación de electrodo con los nanotubos de carbono de pared simple ocasionó un aumento considerable en la corriente de fondo medida con estos electrodos (**Figura 8.54B**, curva a), lo cual se puede atribuir a la alta área superficial activa de los nanotubos conectados eléctricamente a la superficie del electrodo [Lu y Tsai, 2010]. Por otra parte, solo una pequeña respuesta voltamperométrica frente al H_2O_2 fue detectada con este electrodo (**Figura 8.54B**, curva b), lo cual puede atribuirse a las propiedades electrocatalíticas previamente descritas para los nanotubos de carbono [Yang *et al.*, 2010]. Por el contrario, con este electrodo no se fue posible detectar la presencia de D-glucosa en la solución analizada (**Figura 8.54B**, curva c).

Como puede observarse en la **Figura 8.54C**, la corriente catódica aumentó considerablemente en los voltamogramas obtenidos con el electrodo GOx-HRP-JNP/CNT, tras la adición de H_2O_2 y D-glucosa a la celda electroquímica (**Figura 8.54B**, curvas b y c). Este resultado permite sugerir la formación de una interfaz sensora estable y electrocatalíticamente activa sobre la superficie del electrodo, como consecuencia de la interacción de las nanopartículas Janus biofuncionalizadas y los nanotubos de carbono de pared simple. Esta interfaz bienzimática y nanoestructurada favorece la transformación electrocatalítica de H_2O_2 y D-glucosa sobre la superficie del electrodo, generando así señales

8. RESULTADOS Y DISCUSION

analíticas intensas. Sobre la base de estos resultados, se confirmó como óptimo el ensamblaje esquematizado en la **Figura 8.53**, construyéndose de esta forma los electrodos a emplear en experimentos posteriores.

Los parámetros experimentales involucrados en la construcción del electrodo bienzimático fueron optimizados, tomando como variable respuesta la señal amperométrica de los electrodos frente a disoluciones de D-glucosa de concentración 3 μM , empleando un potencial de trabajo de -100 mV vs Ag/AgCl. Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

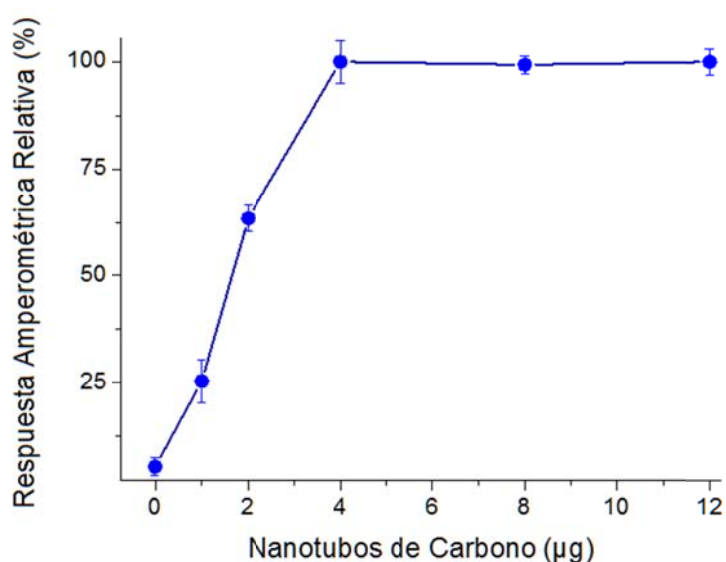


Figura 8.55. Influencia del contenido de nanotubos de carbono de pared simple oxidados sobre la respuesta amperométrica normalizada de los electrodos, empleando como analito D-glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

En la **Figura 8.55** se muestra la influencia de la cantidad de nanotubos de carbono oxidados sobre la respuesta amperométrica de los biosensores construidos con 40 μg de nanopartículas Janus bifuncionalizadas. La intensidad de la corriente catódica medida aumentó con el aumento de la cantidad de nanotubos de carbono empleada, alcanzando un valor máximo de respuesta analítica en los electrodos construidos con 4 μg de nanotubos.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Este hecho permite sugerir que se necesita un grado óptimo de cobertura del electrodo con los nanotubos para la formación de interacciones estables entre este nanomaterial y las nanopartículas Janus bifuncionalizadas.

Asimismo, se comprobó que el valor de corriente catódica mantuvo un valor prácticamente constante para electrodos construidos con un mayor contenido de nanotubos de carbono. Este hecho experimental permite sugerir que, una vez alcanzado el grado óptimo de cobertura de los electrodos con los nanotubos de carbono, un posterior crecimiento de la película de este nanomaterial no mejora su interacción con las nanopartículas Janus bifuncionalizadas. Por tal motivo, se empleó una cantidad de 4 μg de nanotubos de carbono de pared simple oxidados para el recubrimiento de los electrodos preparados para experimentos posteriores.

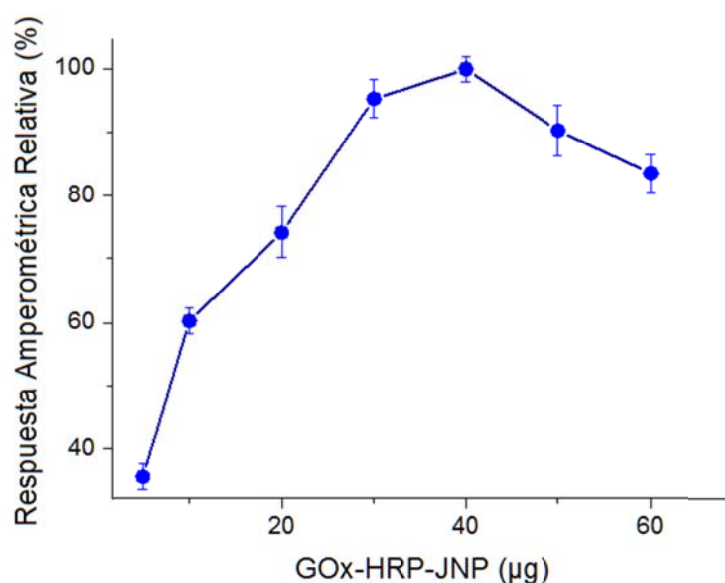


Figura 8.56. Influencia del contenido de nanopartículas Janus bifuncionalizadas sobre la respuesta amperométrica normalizada de los electrodos, empleando como analito D-glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

En la **Figura 8.56** se muestra la influencia del contenido de nanopartículas Janus bifuncionalizadas sobre la respuesta analítica de los electrodos. La respuesta analítica de los

8. RESULTADOS Y DISCUSION

electrodos aumentó con el aumento de la cantidad de nanopartículas depositadas, alcanzándose un valor de máxima intensidad de corriente catódica con los electrodos contruidos con 40 μg de nanopartículas Janus. Por otra parte, un mayor contenido de nanopartículas Janus no genera un aumento en la intensidad de la respuesta amperométrica de los electrodos, lo cual puede estar asociado a una menor estabilidad de la interfaz sensora, provocando el desprendimiento de estas nanopartículas de la superficie del electrodo. De acuerdo a estos resultados, se empleó una cantidad de 40 μg de nanopartículas Janus bifuncionalizadas para la preparación de los electrodos a utilizar en experimentos posteriores.

8.3.3.2. Caracterización del electrodo enzimático.

En la **Figura 8.57** se muestran imágenes de la superficie de los electrodos de carbono vitrificado recubiertos con nanotubos de carbono de pared simple oxidados, antes y después de la deposición de las nanopartículas Janus bifuncionalizadas. Estas imágenes fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo.

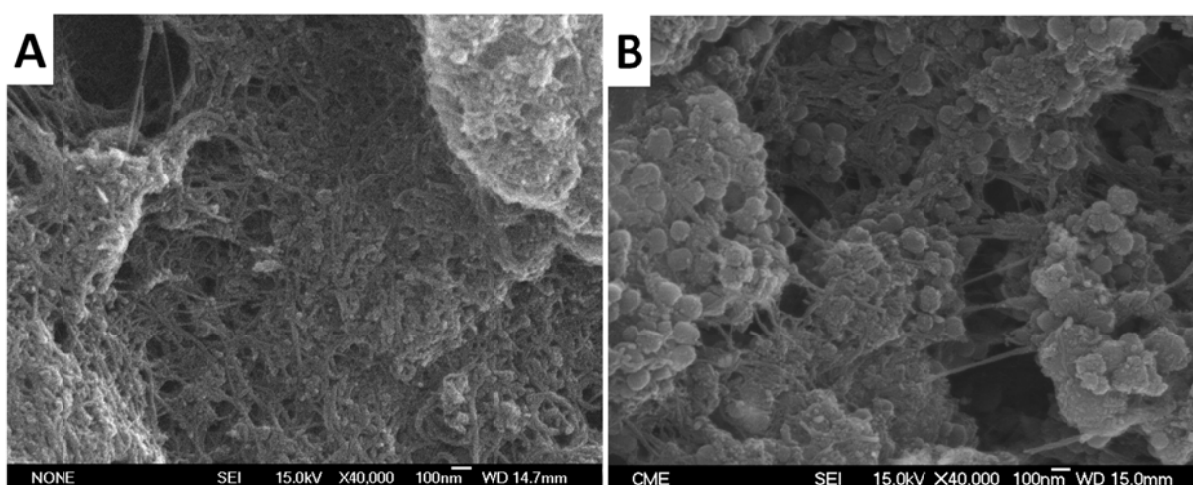


Figura 8.57. Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de los electrodos recubiertos con nanotubos de carbono de pared simple oxidados antes (A) y después de la deposición de las nanopartículas Janus bifuncionalizadas (B).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En **Figura 8.57A** se aprecia claramente la presencia de los nanotubos de carbono, los cuales están homogéneamente distribuidos sobre la superficie electródica, formando una densa red tridimensional. Por otra parte, en la **Figura 8.57B** se observa la presencia de nanopartículas de aproximadamente 100 nm de diámetro, impregnadas dentro de la red tridimensional de nanotubos de carbono de pared simple. Sobre la superficie de varias de estas partículas es claramente observable la presencia de pequeñas nanopartículas. Este hecho permite confirmar la formación de un nanomaterial compósito de nanotubos de carbono de pared simple y nanopartículas Janus sobre la superficie de los electrodos.

En este trabajo se empleó la espectroscopia de impedancia electroquímica como técnica analítica para estudiar las distintas etapas del proceso de ensamblaje del electrodo enzimático, utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. En la **Figura 8.58** se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos en estas mediciones. Los datos experimentales obtenidos en este estudio fueron ajustados a un modelo de circuito equivalente de Randles, en aras de facilitar su correcta interpretación.

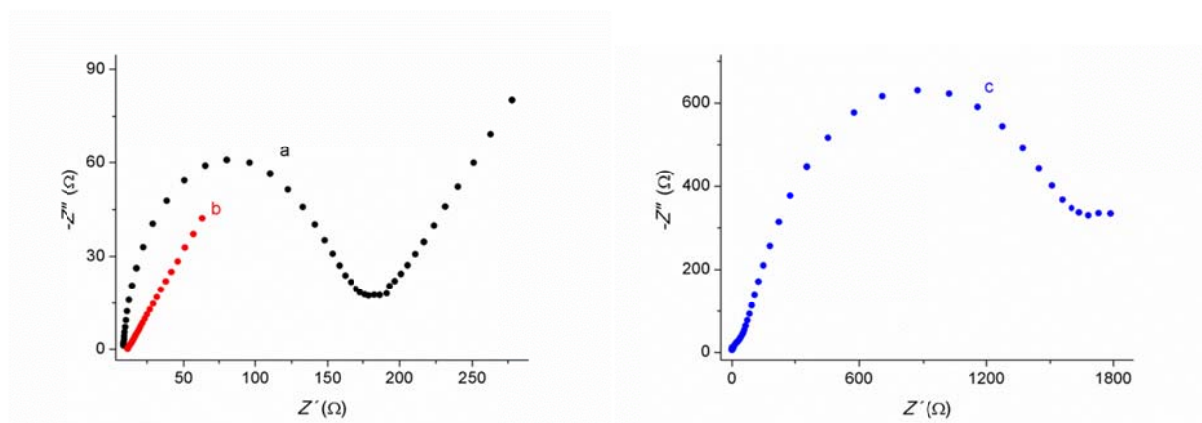


Figura 8.58. Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con los nanotubos de carbono de pared simple (b) y las nanopartículas Janus bifuncionalizadas con enzimas (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM (1:1).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El electrodo no modificado mostró una baja resistencia a los procesos de transferencia de carga interfaciales, con un valor de $R_{TC} = 167 \Omega$ (curva a). El recubrimiento del electrodo con los nanotubos de carbono de pared simple (curva b) provocó una notable disminución del diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist con respecto al electrodo sin modificar. Este comportamiento está asociado a la alta disminución en la resistencia de los procesos de transferencia de carga interfaciales en estos electrodos nanoestructurados, para los cuales se determinó una $R_{TC} = 5 \Omega$. Este fenómeno es consecuencia de la alta conductividad electrónica de estos nanomateriales de carbono.

El diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist correspondiente al espectro de impedancia electroquímica del electrodo nanoestructurado aumentó considerablemente más tras la modificación con las nanopartículas Janus bifuncionalizadas (curva c). Esta variación implica un aumento en la resistencia de los procesos de transferencia de carga en esta superficie electródica, con un valor de $R_{TC} = 1564 \Omega$, el cual es 313 veces superior al del electrodo modificado con los nanotubos de carbono. Este hecho confirma la presencia de una alta concentración de nanopartículas Janus de Au-sílice mesoporosa sobre la superficie del electrodo, y se justifica por las propiedades no conductoras de las nanoestructuras de sílice mesoporosa y de las moléculas de enzimas inmovilizadas sobre este nanomaterial anisotrópico.

8.3.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida.

Las condiciones óptimas de trabajo a emplear con este biosensor bienzimático fueron determinadas midiendo la señal analítica obtenida con el electrodo mediante amperometría en disoluciones agitadas tras la adición del analito D-glucosa, que alcanzó una concentración final en celda de $3 \mu\text{M}$. Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En la **Figura 8.59** se muestra la influencia del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre -0.3 V y 0.1 V vs Ag/AgCl, sobre los valores de la señal amperométrica normalizada del biosensor en presencia de D-glucosa 3 μ M, en una disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0. Los valores de señal analítica máxima fueron obtenidos en los experimentos donde se aplicó un potencial de trabajo de -0.10 V, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

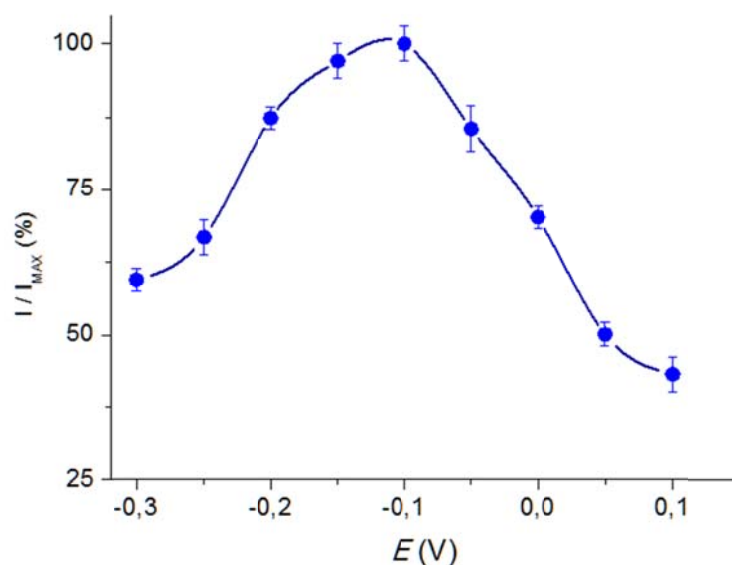


Figura 8.59. Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando D-glucosa 3 μ M en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0.

En la **Figura 8.60** se muestra el perfil de respuesta amperométrica de los electrodos enzimáticos frente a D-glucosa 3 μ M, en función del pH de la solución de medida. Estos experimentos fueron realizando utilizando como potencial de trabajo -0.10 V vs Ag/AgCl, y empleando disoluciones reguladoras de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH, dentro del intervalo de 4.5 a 8.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los mayores valores de respuesta analítica se obtuvieron en los experimentos donde la medición se realizó a pH 6.0, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

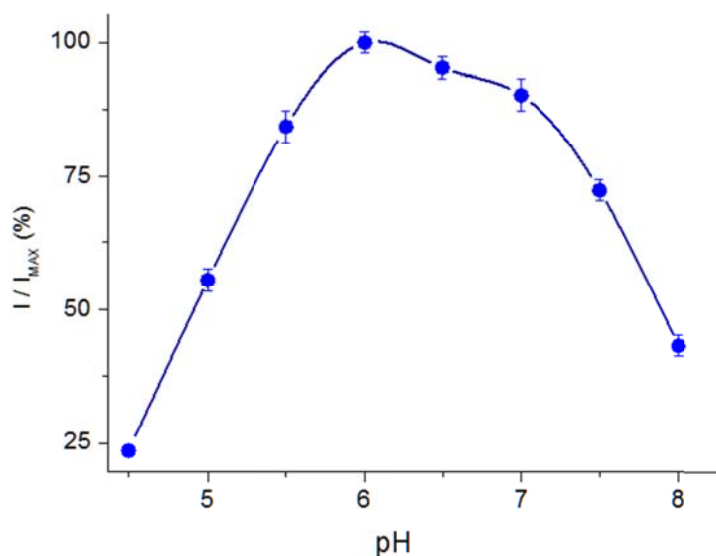


Figura 8.60. Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo, empleando glucosa 3 μM en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH. $E_{apl} = -0.10 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

8.3.4. Características analíticas del biosensor.

8.3.4.1. Especificidad del biosensor.

El electrodo bienzimático preparado fue empleado en la construcción de un biosensor amperométrico para D-glucosa. Para ello se emplearon las condiciones experimentales de medida optimizadas, realizando las mediciones amperométricas en disoluciones agitadas.

Inicialmente, se comprobó la capacidad del biosensor para cuantificar distintos tipos de azúcares, evaluando su respuesta analítica frente a disoluciones de concentración 3 μM de

8. RESULTADOS Y DISCUSION

distintos analitos de este tipo, y comparándola con la respuesta mostrada frente a D-glucosa 3 μM . El biosensor preparado mostró una alta especificidad frente a la D-glucosa, no mostrando señal analítica frente a disoluciones de D-fructosa, D-sacarosa, D-manosa, D-lactosa y D-galactosa.

8.3.4.2. Curva de calibración y rango lineal.

En la **Figura 8.61** se representa la variación de la corriente medida con el biosensor bienzimático tras sucesivas adiciones de D-glucosa. El biosensor mostró una respuesta rápida tras la adición del analito, obteniéndose el 95% de la corriente en el estado estacionario solo 6 segundos después de la adición de D-glucosa.

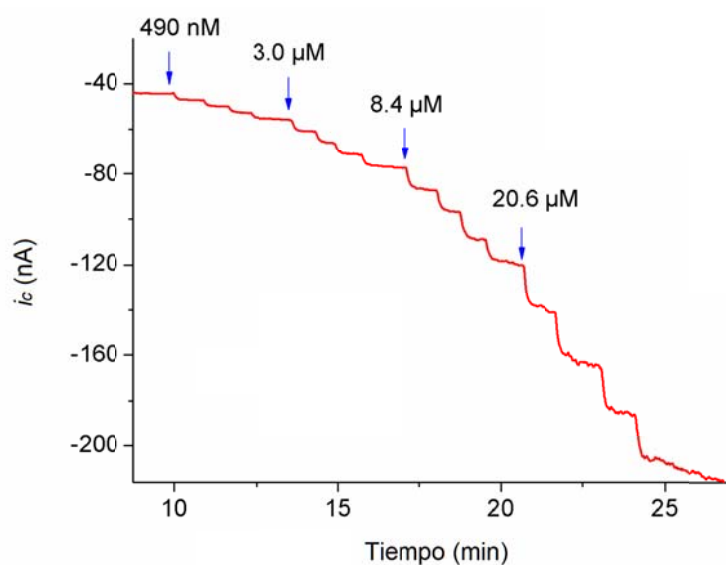


Figura 8.61. Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor bienzimático para adiciones sucesivas de D-glucosa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -0.10$ V vs Ag/Ag/Cl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de intensidad de corriente vs concentración del analito obtenidos en estos experimentos fueron empleados para la construcción de la curva de calibración del biosensor. La curva promedio resultante de estos estudios se muestra en la **Figura 8.62**.

El biosensor bienzimático presentó un comportamiento lineal de la respuesta amperométrica frente a D-glucosa en el intervalo de concentraciones comprendido entre 490 nM y 600 μ M.

Este comportamiento se ajustó a la siguiente ecuación, con un coeficiente de correlación de 0.9996 ($n = 10$):

$$i_c, \text{ mA} = 4.37 \times [\text{D-Glucosa}], \text{ M} + 6.0 \times 10^{-6}$$

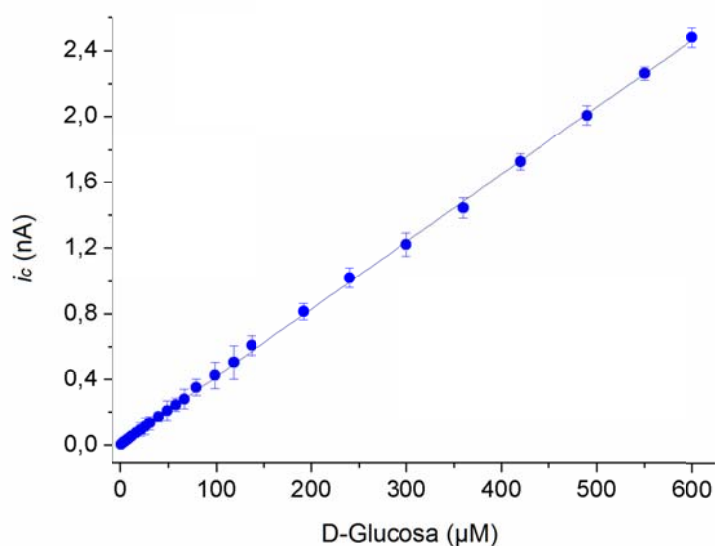


Figura 8.62. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de D-glucosa empleando el biosensor bienzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -0.10 \text{ V vs Ag/Ag/Cl}$.

Este resultado demuestra que el biosensor preparado es capaz de detectar D-glucosa a muy bajas concentraciones, lo cual aumenta sus posibilidades de empleo en la detección de este analito en muestras reales.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.3.4.3. Sensibilidad del biosensor.

La sensibilidad del biosensor se determinó como la pendiente del calibrado entre el área electroactiva del electrodo. El biosensor bienzimático mostró un alto valor de sensibilidad de 62.43 mA/M cm⁻² frente a la D-glucosa.

Tabla 8.4. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores nanoestructurados para D-glucosa.

Electrodo	Rango Lineal (μM)	Sensibilidad ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	LD (μM)	K_M (mM)	Referencia
GOx/rGO-MCNT/GCE	10 – 6500	7.95	4.7	-	[Mani <i>et al.</i> , 2013]
GOx/AuNP/GF/ MCNT/GCE	5 – 175	29.72	4.8	2.09	[Yu <i>et al.</i> , 2014]
GOx/MCNT-SnS ₂ /NF/ GCE	20 – 1950	21.65	4.0	2.71	[Li <i>et al.</i> , 2013]
GOx-CS/NF/PtPd-MCNT/ GCE	62 – 14070	112	31	3.3	[Chen <i>et al.</i> , 2012]
GOx-Ada/CD-PAMAM/PtNP/Au	5 - 705	197	2.0	0.5	[Díez <i>et al.</i> , 2013]
GOx/PtNPs/PAMAM-rGO/GCE	10 - 8100	24.6	0.8	6.9	[Araque <i>et al.</i> , 2014b]
GOx/rGO/GCE	100 - 27000	1.85	100	-	[Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2013]
GOx-Fe ₃ O ₄ @Au/ SPCE (MnO ₂)	200 - 9000	2.52	100	-	[Samphao <i>et al.</i> , 2015]
GOx-HRP-JNP/CNT/GCE	0.49 - 600	62.43	0.36	1.3	Presente trabajo

GOx: glucosa oxidasa; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **MCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **AuNP:** nanopartículas de Au; **GF:** grafeno; **SnS₂:** nanoláminas de SnS₂; **CS:** quitosano; **PtPd:** nanopartículas de Pt-Pd; **Ada:** adamantano; **CD:** β -ciclodextrina; **PAMAM:** dendrímeros o dendrones de poliamidoamina G-4; **PtNP:** nanopartículas de Pt; **Fe₃O₄@Au:** nanopartículas de Fe₃O₄ decoradas con nanopartículas de Au; **SPCE(MnO₂):** electrodos serigrafiados de carbono modificados con MnO₂.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Asimismo, se calculó un valor de sensibilidad de 4.37 mA/M a partir de la pendiente de la curva de calibración, sin tomar en consideración el valor de área electroactiva del electrodo. En general, la sensibilidad mostrada por el biosensor construido fue mucho mayor que la descrita para otros dispositivos similares, tal como se muestra en la **Tabla 8.4**.

8.3.4.4. Límite de detección del biosensor.

De forma similar a los trabajos anteriores, el límite de detección para este biosensor se calculó de acuerdo con el criterio $3\text{-SD}/m$, siendo m la pendiente del intervalo lineal del calibrado y SD la desviación estándar de las señales de intensidad de corriente obtenidas para 10 adiciones de patrón de D-glucosa de concentración igual a la más baja medida en el calibrado (490 nM).

El límite de detección estimado para este biosensor fue de 360 nM ($n=10$), el cual fue mucho menor que el descrito para otros biosensores para D-glucosa.

En la **Tabla 8.4** se muestran las características analíticas del biosensor bienzimático preparado, las cuales se comparan con las de otros dispositivos electroanalíticos previamente descritos en la literatura.

8.3.4.5. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático.

Las constantes cinéticas aparentes $K_{M(ap)}$ e $I_{MAX(ap)}$ fueron determinadas empleando el método gráfico de Lineweaver-Burk, el cual fue aplicado a los datos obtenidos de la medición amperométrica de disoluciones de D-glucosa de diferentes valores de concentración. Los valores calculados para estos parámetros cinéticos fueron $K_{M(ap)} = 1.3$ mM e $I_{MAX(ap)} = 3.1$ nA.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

La constante aparente de Michaelis determinada para la enzima inmovilizada en la superficie del biosensor fue 25 veces menor que la descrita para la enzima en disolución (33 mM) [Swoboda y Massey, 1965]. Este hecho permite sugerir que las nanopartículas Janus constituyen un soporte excelente para la inmovilización de esta enzima, favoreciendo una mayor afinidad aparente por su sustrato.

8.3.4.6. Repetitividad de las medidas.

Para estudiar la repetitividad entre medidas, se determinó la señal analítica del biosensor frente a 10 adiciones de D-glucosa, que generaron una concentración final en la celda electroquímica de 3 μM . Para estos experimentos se empleó un único biosensor enzimático. Tomando en consideración el valor medio y la desviación estándar de los valores obtenidos para estas mediciones electroanalíticas, se obtuvo un valor de R.S.D. de 5.9%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena repetitividad de las medidas llevadas a cabo con el biosensor.

8.3.4.7. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

La reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor fue determinada a partir de la respuesta amperométrica de 10 biosensores fabricados de la misma manera, frente a disoluciones de D-glucosa de concentración 3.0 μM . La RSD calculada para estas mediciones fue de 8.6%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena reproducibilidad del proceso de construcción del biosensor enzimático.

8.3.4.8. Interferencias.

Para este estudio se seleccionaron 5 compuestos químicos con potencial efecto interferente sobre la medida del biosensor: D-galactosa, D-sacarosa, L-arabinosa, D-fructosa

8. RESULTADOS Y DISCUSION

y ácido ascórbico. Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de D-glucosa de concentración 3.0 μM , en ausencia y presencia de los potenciales compuestos interferentes.

Como resultado de estos experimentos se observó que los azúcares evaluados como posibles agentes interferentes no afectaron la señal amperométrica del biosensor, aun cuando su concentración en la celda electroquímica fuera 10 veces superior a la de D-glucosa.

Sin embargo, se observó que al ácido ascórbico si presentaba acción interferente sobre la medición del biosensor. En este sentido, se determinó que concentraciones en celda de 1.0 μM de ácido ascórbico produjeron un incremento del 38% en el valor de corriente catódica del biosensor frente a D-glucosa 3.0 μM . Este hecho pudiera limitar el uso del biosensor bienzimático en muestras donde se utilice ácido ascórbico como sustancia preservante, y sugiere la necesidad de realizar estudios posteriores orientados a disminuir el efecto interferente de esta sustancia sobre el biosensor preparado.

8.3.4.9. Tiempo de vida útil del biosensor.

Para determinar la estabilidad de almacenamiento del biosensor bienzimático, se prepararon 5 electrodos según el protocolo propuesto. Estos electrodos fueron almacenados a 4 °C y en oscuridad, en condiciones de sequedad, y fueron periódicamente evaluados mediante la determinación de su respuesta amperométrica frente a D-glucosa 3.0 μM . Este experimento tuvo un mes de duración.

En la **Figura 8.63** se muestra la influencia del tiempo de incubación sobre la respuesta analítica normalizada de estos biosensores. El biosensor bienzimático mostró una excelente estabilidad a lo largo del tiempo, reteniendo el 98% de la actividad inicial después de 15 días de almacenaje. A mayores tiempos de conservación se apreció una disminución de la capacidad analítica del biosensor, proceso que siguió una cinética de primer orden. En este

8. RESULTADOS Y DISCUSION

sentido, el biosensor bienzimático retuvo aproximadamente el 64% de la actividad inicial tras un mes de almacenamiento.

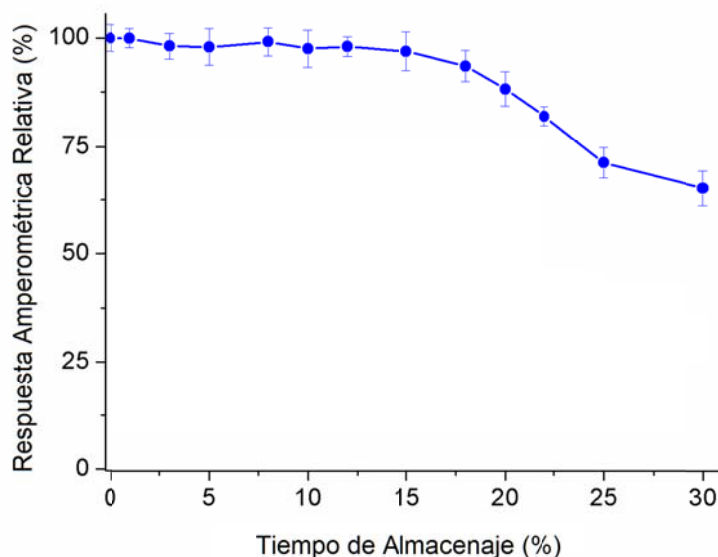


Figura 8.63. Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.

Este hecho pudiera estar asociado a la reutilización de los biosensores, los cuales fueron empleados en cada una de las mediciones efectuadas durante el mes de duración del experimento. Tal procedimiento pudiera afectar la estabilidad de las enzimas co-inmovilizadas en las nanopartículas Janus, las cuales son periódicamente sometidas a procesos de cambios de temperatura y a la acción inactivante del H_2O_2 producido durante las determinaciones electroanalíticas. No obstante, consideramos que la estabilidad mostrada por este biosensor es suficiente para asegurar su aplicación práctica en la determinación de D-glucosa en muestras de alimentos.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.3.5. Evaluación del biosensor en la determinación del contenido de D-glucosa en muestras de refrescos.

El biosensor desarrollado fue evaluado como dispositivo analítico para la determinación cuantitativa del contenido de D-glucosa en dos muestras distintas de refrescos comerciales. Las muestras analizadas fueron de refrescos Pepsi® de cola y KAS® de naranja.

De forma paralela, se determinó el contenido de D-glucosa en estas muestras empleando un kit colorimétrico comercial de Sigma-Aldrich, basado en las reacciones enzimáticas acopladas de la hexoquinasa y la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ambos casos se empleó D-glucosa como sustancia patrón, comprobándose que había efecto matriz para las determinaciones electroanalíticas. Por tal motivo, estas se desarrollaron empleando el método de la adición de estándar en muestras de los refrescos adecuadamente diluidas. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado con cada uno de los métodos.

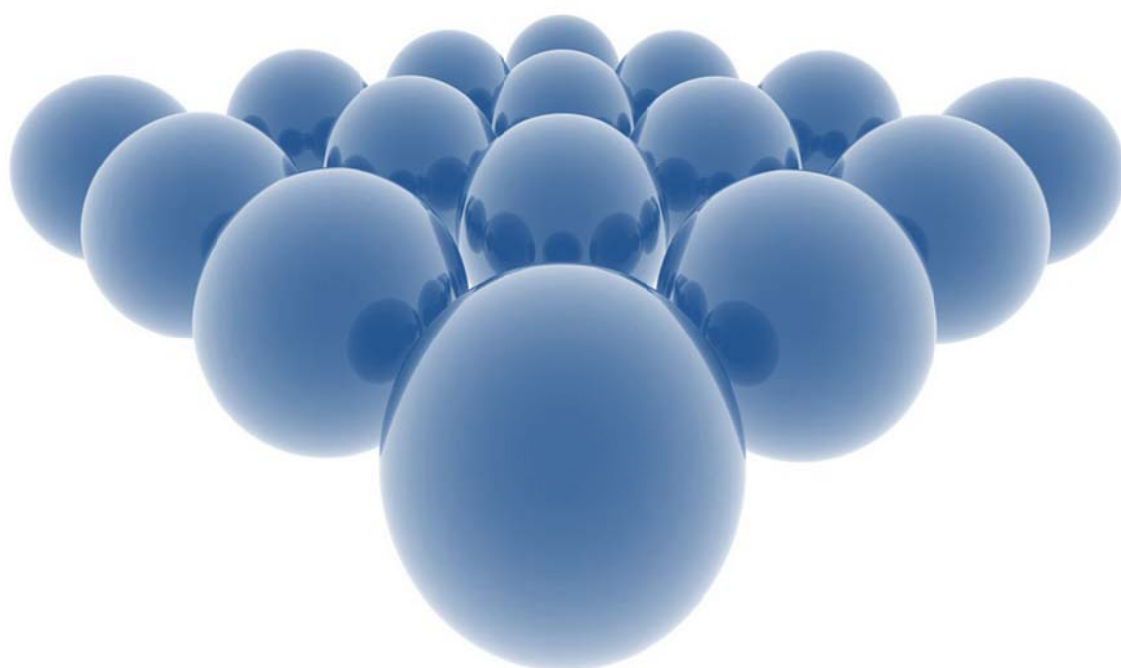
Tabla 8.5. Determinación del contenido de D-glucosa en muestras de refrescos comerciales.

Muestras	D-Gucosa (g/100 mL)		Recuperación (%)
	Método Colorimétrico	Método Electroanalítico	
Pepsi®	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.4	104.8
KAS®	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.3	97.4

Como se muestra en la **Tabla 8.5**, existe una excelente similitud entre los valores de concentración de D-glucosa y de recuperación determinados en ambas muestras mediante el uso de los métodos colorimétrico y electroquímico. Estos resultados validan el uso del biosensor electroquímico para estas determinaciones.

8.4

Plataformas de detección electroquímica basadas en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro



8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4. Plataformas de detección electroquímica basadas en nanocintas de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro.

8.4.1. Preparación del nanomaterial híbrido de nanocintas de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro.

Uno de los aspectos más novedosos de la presente investigación ha sido la preparación de un nuevo nanomaterial híbrido basado en polímeros de coordinación dopados con nanopartículas de oro, y su evaluación para la construcción de sistemas sensores y biosensores electroquímicos. La estrategia empleada en el diseño de este nuevo nanohíbrido se basó en la preparación de nanopartículas de oro bifuncionalizadas con residuos de 4-mercaptopiridina y 6-mercapto-1-hexanol, con las cuales se decoraron nanocintas de plata-bipiridina mediante la formación de enlaces de coordinación.

En la **Figura 8.64** se representa el proceso de preparación de este nanohíbrido.

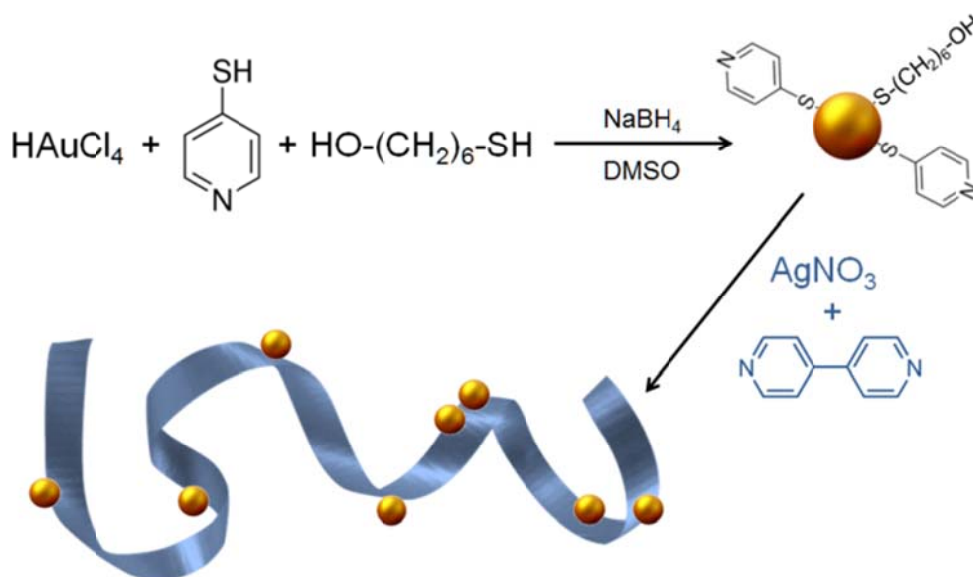


Figura 8.64. Representación esquemática de las reacciones involucradas en la preparación del nanohíbrido de coordinación de plata-bipiridina decorado con nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Las nanopartículas de oro bifuncionalizadas fueron preparadas con dos tipos de ligandos tiolados diferentes, los cuales desempeñan funciones distintas en el nanomaterial resultante:

- *4-Mercaptopiridina*: Ligando encargado de facilitar la formación de enlaces de coordinación con los iones Ag(I) de las nanocintas.
- *6-Mercapto-1-hexanol*: Ligando encargado de conferir solubilidad y estabilidad coloidal a las nanopartículas en el medio de reacción durante la formación del nanohíbrido.

Un aspecto fundamental en el diseño de estos nanomateriales es la relación molar en que estos ligandos deberán aparecer sobre la superficie de la nanopartícula, en aras de lograr un equilibrio entre la capacidad de coordinación y las propiedades de solubilidad adecuadas para su empleo en el medio de reacción. Para los trabajos aquí presentados se determinó como condiciones óptimas de síntesis de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas el uso de los ligandos 4-mercaptopyridina y 6-mercapto-1-hexanol en una relación molar de 1:3.

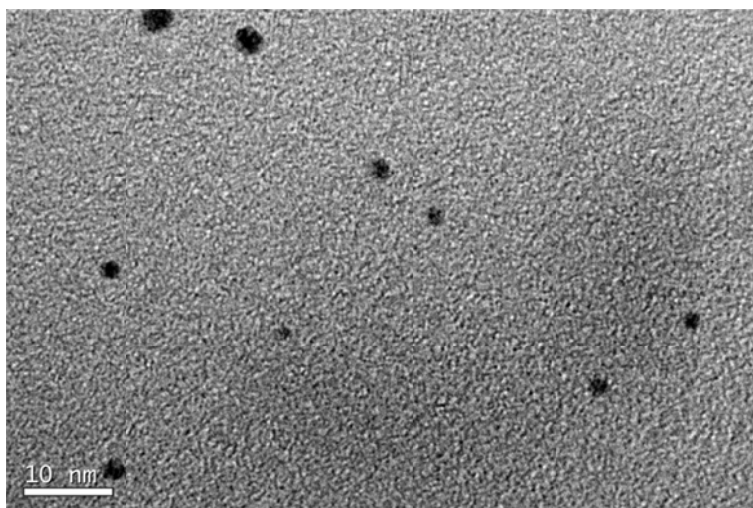


Figura 8.65. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

Las nanopartículas fueron caracterizadas mediante diferentes métodos fisicoquímicos y de microscopía. En la **Figura 8.65** se muestra una imagen representativa de estos

8. RESULTADOS Y DISCUSION

nanomateriales, obtenidas mediante análisis por microscopía electrónica de transmisión. Como puede observarse las nanopartículas funcionalizadas poseen una geometría esférica con un diámetro medio de (2.6 ± 0.7) nm. En la **Figura 8.66** se muestra además la distribución de tamaño de estas nanopartículas.

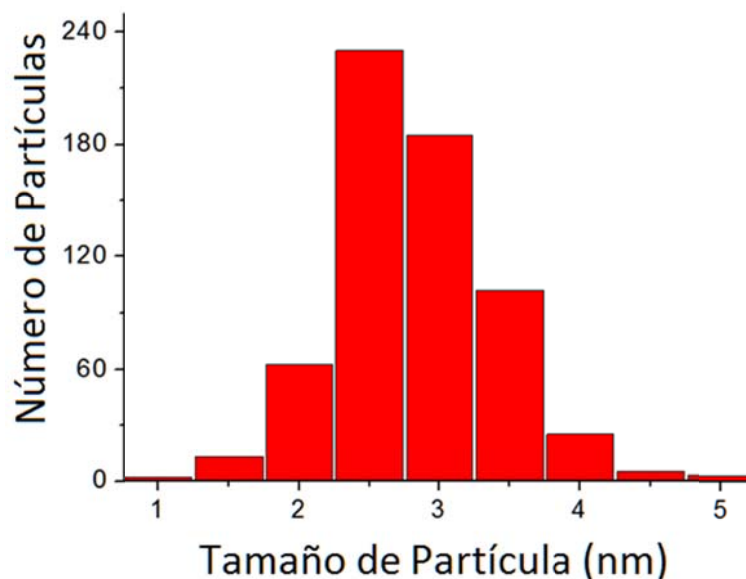


Figura 8.66. Distribución de tamaño de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

La geometría radial y el tamaño pequeño mostrados por estas nanopartículas ponen de manifiesto que durante el desarrollo sintético la reducción del metal y la fijación de los ligandos tiolados a la superficie de las partículas de oro ocurren en único paso, como se comentó con anterioridad [Liu *et al.*, 2000].

Las nanopartículas de oro bifuncionalizadas fueron preparadas mediante una modificación del método propuesto por Liu y colaboradores para la síntesis de nanopartículas metálicas recubiertas con ciclodextrinas [Liu *et al.*, 2000]. Este procedimiento se basa en la reducción *in situ* de HAuCl_4 con NaBH_4 en DMSO, en presencia de los ligandos tiolados a ser empleados como agentes de modificación superficial de las nanopartículas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Esta metodología permite la preparación de nanopartículas polifuncionalizadas de color rojo oscuro, solubles en agua y de diámetro muy pequeño, debido a la rápida quimisorción de los ligandos tiolados sobre la superficie de los coloides recién formados. Estos procesos de quimisorción *in situ* limitan el crecimiento posterior de estos nanomateriales, produciendo nanopartículas con un tamaño adecuado para la posterior formación de las redes electropolimerizadas.

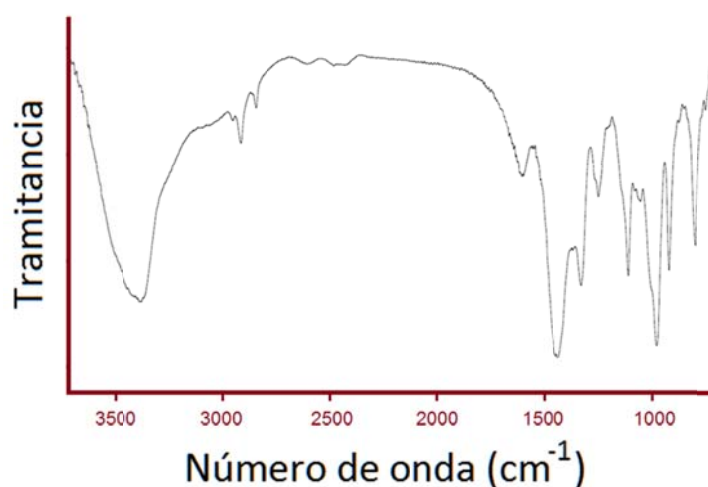


Figura 8.67. Espectro FT-IR de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

La modificación de la superficie de las nanopartículas de oro con los ligandos tiolados fue confirmada mediante espectroscopia FT-IR. Como se aprecia en la **Figura 8.67**, la presencia de los residuos de 4-mercaptopiridina fue confirmada a partir de las bandas a 1622 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} y 1347 cm^{-1} , las cuales pueden ser respectivamente adscritas a los estiramientos simétricos, y a las flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano de los grupos C-H en los anillos de piridina. Por otra parte, los residuos de 6-mercapto-1-hexanol unidos a la superficie de las nanopartículas fueron identificados a partir de la ancha banda a 3384 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de los grupos O-H; así como por las bandas a 2920 cm^{-1} y 1002 cm^{-1} , las cuales pueden ser asignadas a la vibración de los grupos C-H y C-O, respectivamente.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

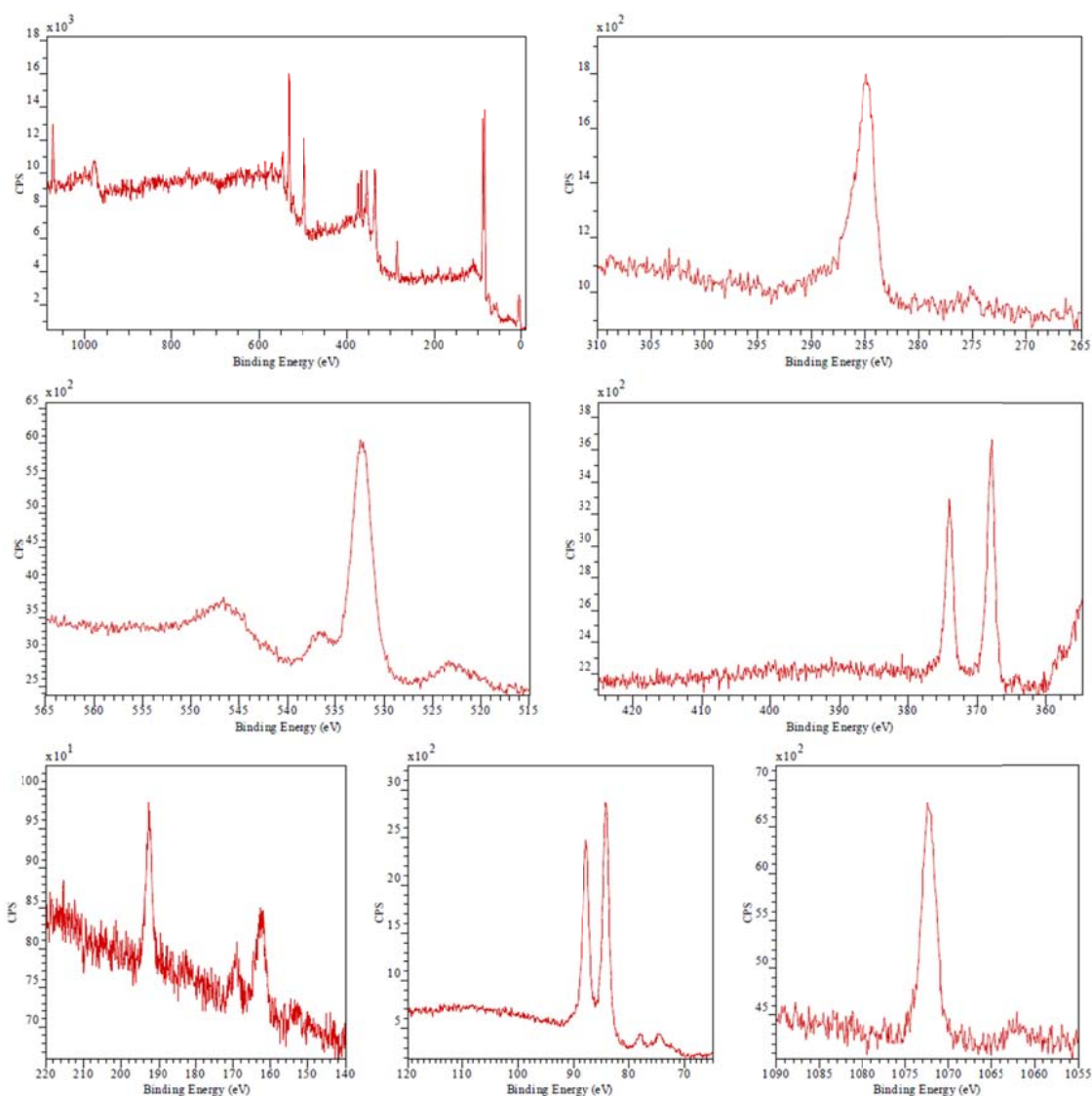


Figura 8.68. Espectros XPS de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

Las nanopartículas de oro bifuncionalizadas fueron caracterizadas mediante XPS, y los espectros correspondientes a estos estudios se muestra en la **Figura 8.68**. En los espectros de las nanopartículas se pueden apreciar los picos característicos de Au⁰: el doblete 4f a 84.1 eV ($4f_{7/2}$) y 87.7 eV ($4f_{5/2}$), el doblete 4d a 368.2 eV ($4d_{5/2}$) y 374.1 eV ($4d_{3/2}$), y el componente $4p_{3/2}$ del doblete 4p a 532.4 eV.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4.2. Caracterización de los nanohíbridos de coordinación de plata-bipiridina decoradas con nanopartículas de oro.

En este trabajo se prepararon nanohíbridos de plata-bipiridina con diferente contenido de nanopartículas de oro, en aras de evaluar el efecto de estas nanopartículas dopantes sobre las propiedades del nanomaterial resultante. Estos nanomateriales híbridos fueron caracterizados mediante microscopia electrónica de barrido con emisión de campo, espectroscopia de fluorescencia de rayos X, microscopia electrónica de transmisión y XPS.

Asimismo, se comprobó que estos nanohíbridos se comportaban como compuestos enzimomiméticos, presentando actividad tipo peroxidasa. Esta característica fue estudiada mediante métodos electroquímicos y espectrofotométricos.

8.4.2.1. Caracterización de los nanohíbridos mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X.

Los nanohíbridos preparados fueron denominados según el contenido estimado de oro en cada uno de ellos, de acuerdo a las condiciones de síntesis empleadas. La composición real de estos nanomateriales fue posteriormente comprobada mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X. Los resultados de estas determinaciones se recogen en la **Tabla 8.6**.

Como puede apreciarse, existe una alta correlación entre los valores de composición estimados para cada uno de estos nanohíbridos y los resultados obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X. Este hecho confirma la eficiencia de la estrategia de preparación utilizada, así como la capacidad de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas de asociarse a los polímeros de coordinación de plata-bipiridina.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 8.6. Valores de composición de los nanohíbridos obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X.

Muestras	Au/Ag ($\mu\text{mol/mol}$)	
	Estimado	Fluorescencia de rayos X
Au-NB0	0	-
Au-NB50	50	43
Au-NB100	100	93
Au-NB150	150	151
Au-NB200	200	188
Au-NB300	300	287

8.4.2.2. Caracterización de los nanohíbridos mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo.

La morfología de los nanohíbridos preparados fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo. En la **Figura 8.69** se muestran imágenes representativas de dichas determinaciones.

El nanohíbrido Au-NB0 (**Figura 8.69A**), que no contiene nanopartículas de oro, presenta una morfología plana en forma de nanocintas, característica de este tipo de nanomaterial [Luo *et al.*, 2011]. Una morfología similar, pero con nanoestructuras particuladas aleatoriamente distribuidas sobre la estructura del nanomaterial, se observó en el nanohíbrido Au-NB50 (**Figura 8.69B**). Por otra parte, en aquellos nanohíbridos con mayor contenido de nanopartículas de oro (Au-NB100 y Au-NB150), se aprecia la formación de agregados de estas nanopartículas sobre la superficie del nanomaterial (**Figuras 8.69C,D**), las cuales no afectan la morfología de nanocintas de los nanohíbridos.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

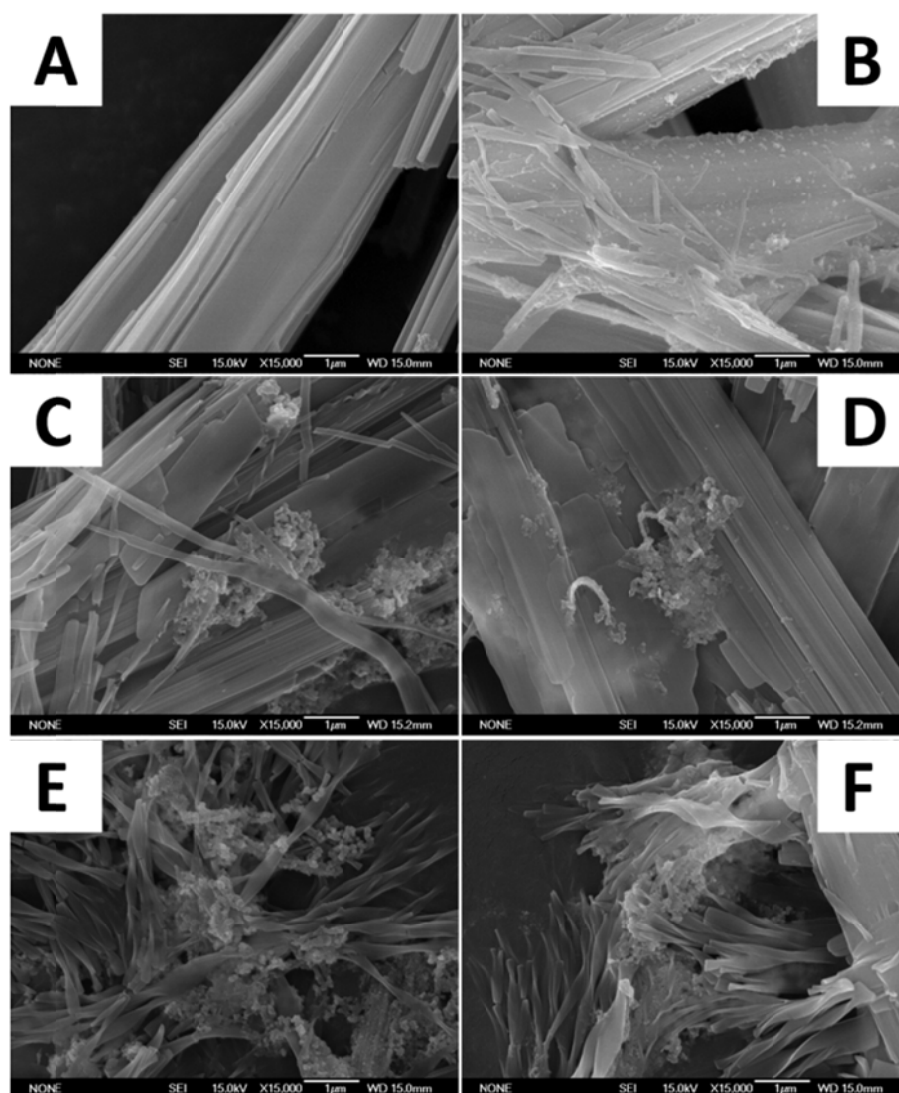


Figura 8.69. Imágenes de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de los nanohíbridos Au-NB0 (a), Au-NB50 (b), Au-NB100 (c), Au-NB150 (d), Au-NB200 (e) y Au-NB300 (f).

Sin embargo, esta morfología laminar cambia drásticamente a estructuras dedríticas tipo fractales para los nanohíbridos Au-NB200 y Au-NB300, los cuales poseen un mayor contenido de nanopartículas de oro (**Figuras 8.69E,F**). Este hecho permite suponer que la coordinación de las nanopartículas de oro con los polímeros de coordinación de plata-piridina afecta la dirección lineal de crecimiento de estos nanohíbridos, modulando la morfología final del nanomaterial resultante. Tal efecto puede estar condicionado por la

8. RESULTADOS Y DISCUSION

naturaleza multivalente de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas, las cuales, al presentar residuos de 4-mercaptopiridina sobre toda su superficie, favorecen la ramificación tridimensional de estos polímero de coordinación.

8.4.2.3. Caracterización del nanohíbrido Au-NB200 mediante microscopía electrónica de transmisión.

Como se describirá en las **Secciones 8.4.2.5** y **8.4.2.6**, el nanohíbrido Au-NB200 mostró mejores propiedades catalíticas y electrocatalíticas frente al H_2O_2 . Por tal motivo, este nanomaterial fue caracterizado con mayor rigor, empleando técnicas adicionales.

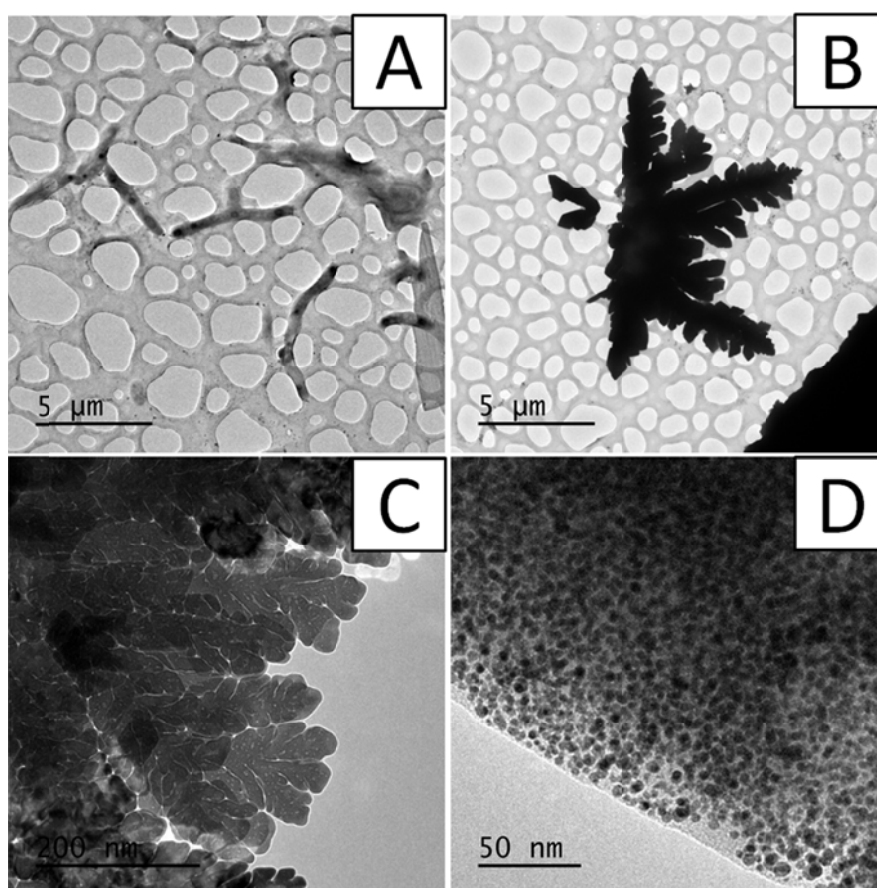


Figura 8.70. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nanohíbridos Au-NB0 (A), y Au-NB200 (B-D).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

En la **Figura 8.70** se muestran imágenes de este nanomaterial, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. A modo de comparación, se muestra también la imagen del nanomaterial Au-NBO, no dopado con nanopartículas de oro.

El nanohíbrido Au-NBO mostró una morfología de cintas, en las que no se aprecia la presencia de nanoestructuras particuladas (**Figura 8.70A**). Por el contrario, el nanohíbrido Au-NB200 mostró una morfología dendrítica tipo fractal, con un tamaño promedio de (11 ± 4) μm (**Figuras 8.70B,C**). En imágenes obtenidas a mayor grado de magnificación se pudo fácilmente apreciar una alta presencia de nanopartícula de oro, homogéneamente distribuidas dentro de la estructura del nanomaterial híbrido (**Figura 8.70D**). En la **Figura 8.71** se muestra la distribución de tamaño de este nanomaterial.

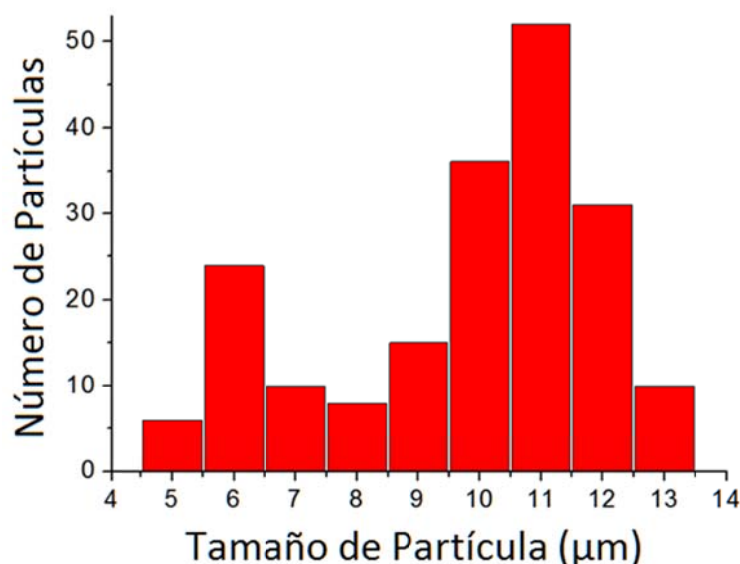


Figura 8.71. Distribución de tamaño del nanohíbrido Au-NB200.

8.4.2.4. Caracterización del nanohíbrido Au-NB200 mediante XPS.

En las **Figuras 8.72** y **8.73** se muestran los espectros XPS de los nanohíbridos Au-NBO y Au-NB200.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

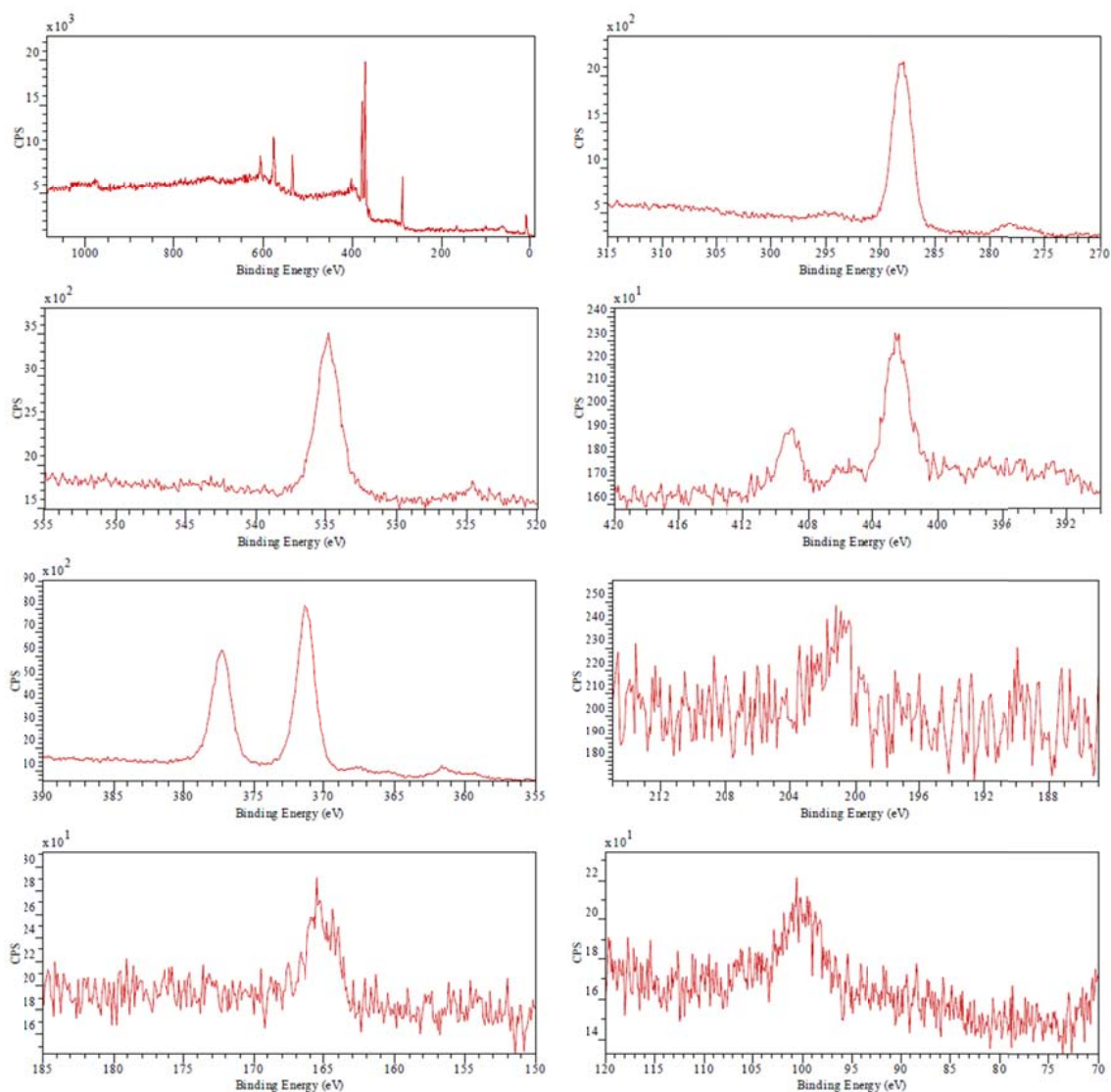


Figura 8.72. Espectros XPS del nanohíbrido Au-NB0.

El espectro del nanomaterial Au-NB0 se caracteriza fundamentalmente por la presencia de un prominente doblete 3d a 371.4 eV ($3f_{5/2}$) y 377.3 eV ($3f_{3/2}$), correspondiente al catión Ag^+ . Estos picos también se encuentran presentes en el espectro XPS del nanohíbrido Au-NB200, aunque ligeramente desplazados a 370.9 eV ($3f_{5/2}$) y 376.8 eV ($3f_{3/2}$), debido a la interacción con los grupos quelatantes en la superficie de las nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Por otra parte, la presencia de estas nanopartículas en el nanohíbrido fue confirmada por los picos a 87.3 eV ($4f_{7/2}$) y 90.9 eV ($4f_{5/2}$). La variación observada en el doblete $4d$ del oro sugiere una alta perturbación de los electrones en la superficie de las nanopartículas, lo cual puede ser originado por la proximidad de los iones de plata unidos a los ligandos de 4-mercaptopiridina sobre la superficie de las nanopartículas.

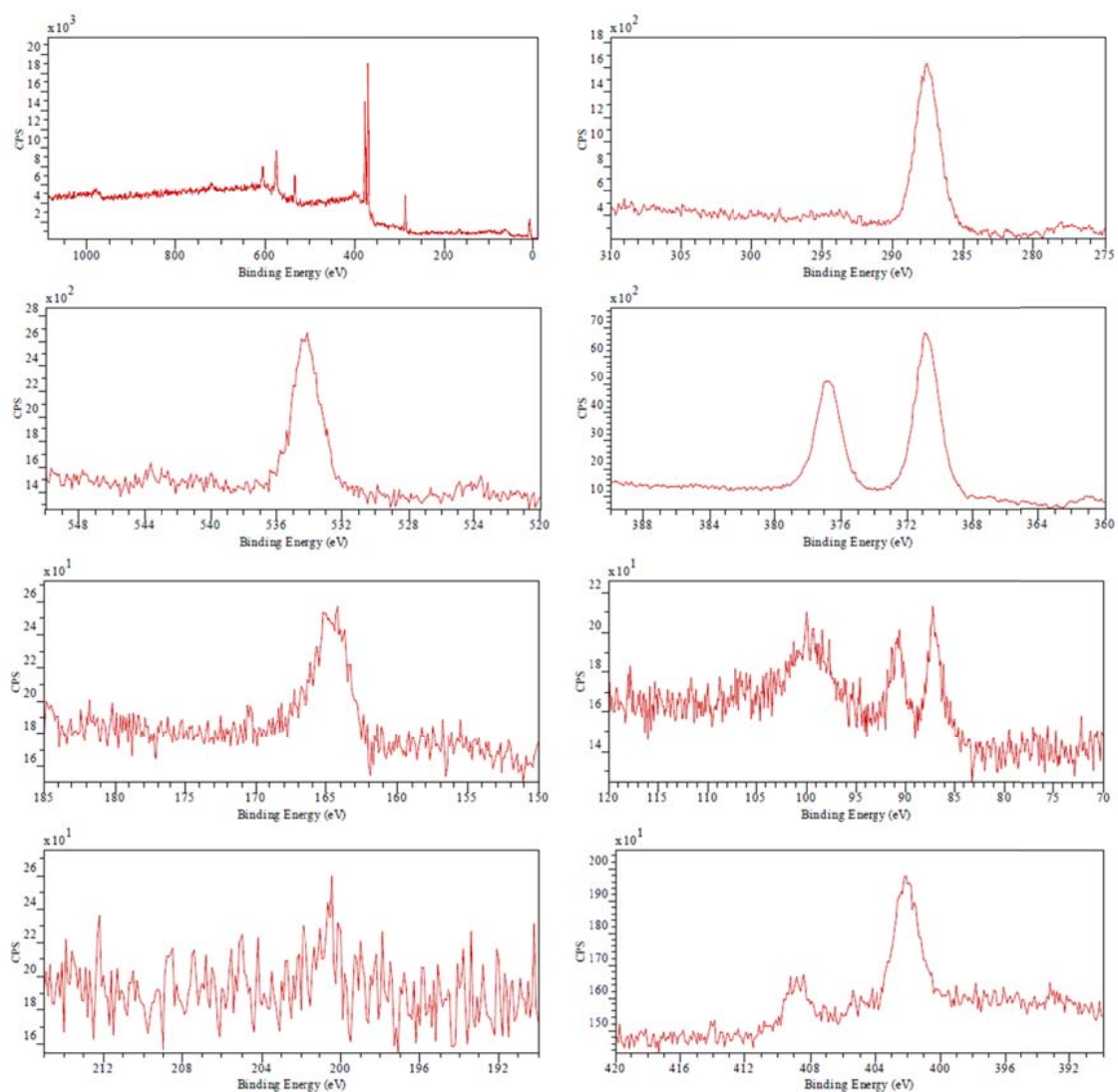


Figura 8.73. Espectros XPS del nanohíbrido Au-NB200.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4.2.5. Determinación de la actividad tipo peroxidasa de los nanohíbridos.

La capacidad de los nanohíbridos de actuar como enzimas artificiales con actividad tipo peroxidasa fue estudiada mediante ensayo espectrofotométrico, empleando H_2O_2 y ABTS como sustratos [Jiang y Penner, 2015]. La cinética de esta transformación fue determinada mediante el incremento de la absorbancia de la mezcla reaccionante a 405 nm, la cual está directamente condicionada por la formación del radical $ABTS^+$, de color verde en disoluciones acuosas. En la **Figura 8.74** se representa la reacción catalítica involucrada en esta transformación.

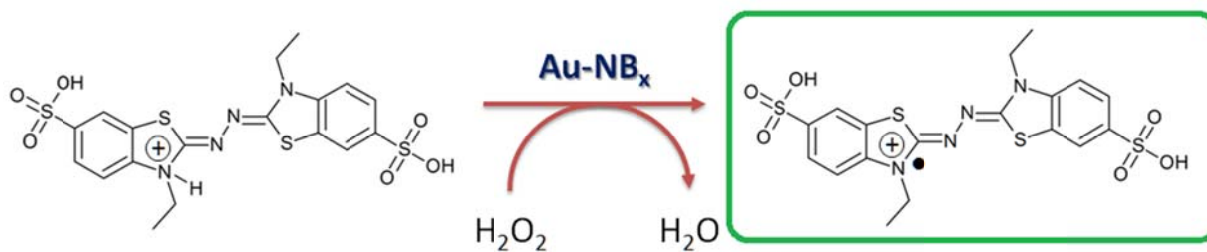


Figura 8.74. Representación esquemática de la reacción de oxidación de ABTS con H_2O_2 , catalizada por los nanohíbridos de coordinación de plata-bipiridina decorados con nanopartículas de oro bifuncionalizadas.

Como se observa en la **Figura 8.75**, el nanohíbrido $Au-NB0$ que no contiene nanopartículas de oro no presentó actividad mimética tipo peroxidasa. Sin embargo, todos los nanohíbridos decorados con nanopartículas de oro provocaron un notable incremento en el valor de absorbancia a 405 nm de las mezclas de reacción, lo que confirma su acción catalítica sobre el proceso de oxidación de ABTS con H_2O_2 .

8. RESULTADOS Y DISCUSION

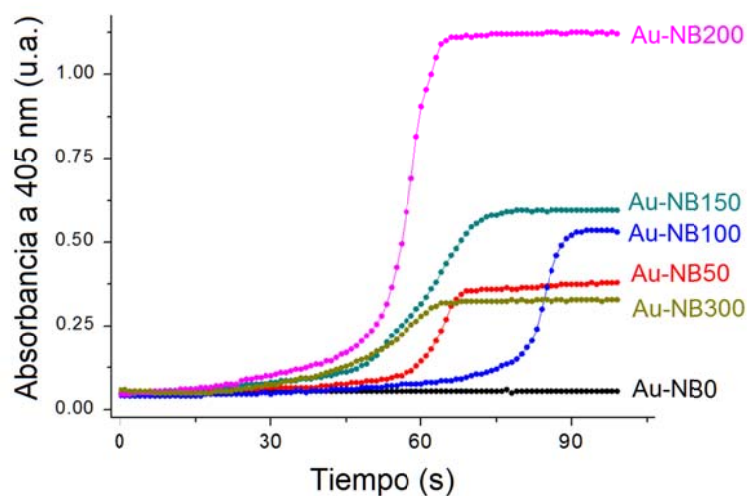


Figura 8.75. Efecto del tiempo de incubación sobre la absorción a 405 nm de disoluciones de ABTS 9 mM y H_2O_2 3 mM, en fosfato de sodio 40 mM, pH 7.0, en presencia de diferentes nanohíbridos de coordinación a concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Esta actividad tipo peroxidasa dependió claramente del contenido de nanopartículas de oro en el nanohíbrido. En este sentido, los mayores valores de incremento de absorción y de velocidad inicial de la reacción (V_0) fueron observados para el proceso catalizado por el nanohíbrido Au-NB200 (Figura 8.76).

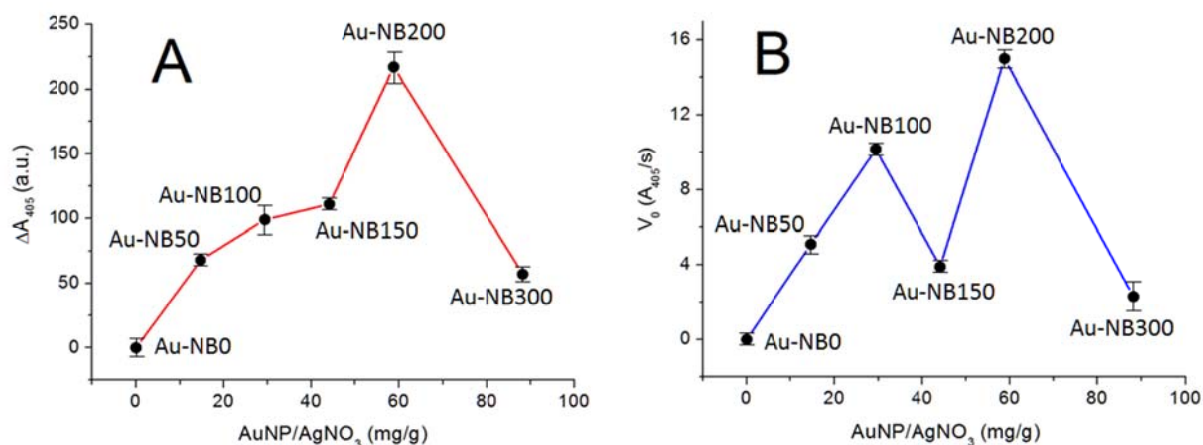


Figura 8.76. Efecto del contenido de nanopartículas de oro bifuncionalizadas sobre el incremento máximo de la absorción a 405 nm (A) y la velocidad inicial de reacción (B).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el objetivo de elucidar el mecanismo catalítico de este nanohíbrido con mayor actividad tipo peroxidasa, se realizaron estudios cinéticos siguiendo la aproximación del estado estacionario. En la **Figura 8.77** se muestra el efecto de la concentración de ABTS y H_2O_2 sobre la velocidad inicial de estas reacciones, considerando para ello el rango de respuesta lineal tras la fase de retardo mostrado por estos sistemas. El proceso catalizado por el nanohíbrido Au-NB200 mostró un perfil cinético que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten.

Los parámetros cinéticos aparentes de este proceso fueron determinados mediante el método de doble recíproca de Lineweaver-Burk plots. El nanohíbrido Au-NB200 mostró una constante cinética de Michaelis (K_M) de 0.44 M, y un valor de velocidad máxima (V_{max}) de $73.4 \times 10^{-2} \mu\text{M/s}$ para el ABTS. En este sentido, la afinidad aparente de este nanohíbrido por el ABTS fue significativamente menor que la mostrada por la peroxidasa de rábano [**Kamal y Behere, 2003**]. Por el otra parte, el nanomaterial mostró valores de $K_M = 1.9 \text{ mM}$ y $V_{max} = 82.0 \times 10^{-2} \mu\text{M/s}$ para el H_2O_2 .

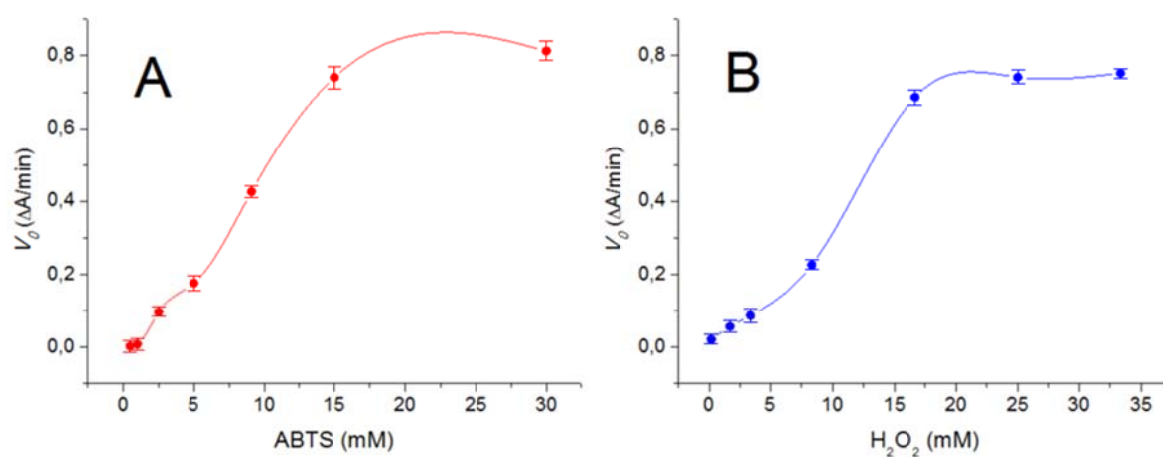


Figura 8.77. Efecto de la concentración de ABTS (A) y H_2O_2 (B) sobre la velocidad inicial de las reacciones catalizadas por el nanohíbrido Au-NB200. Concentración de H_2O_2 en (A) = 3 mM; concentración de ABTS en (B) = 9 mM.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4.2.6. Determinación de la actividad electrocatalítica de los nanohíbridos.

Una vez demostrada la capacidad de los nanohíbridos de actuar como enzimas artificiales con actividad tipo peroxidasa, se evaluaron sus propiedades electrocatalíticas frente al H_2O_2 empleando la voltametría cíclica como técnica electroanalítica.

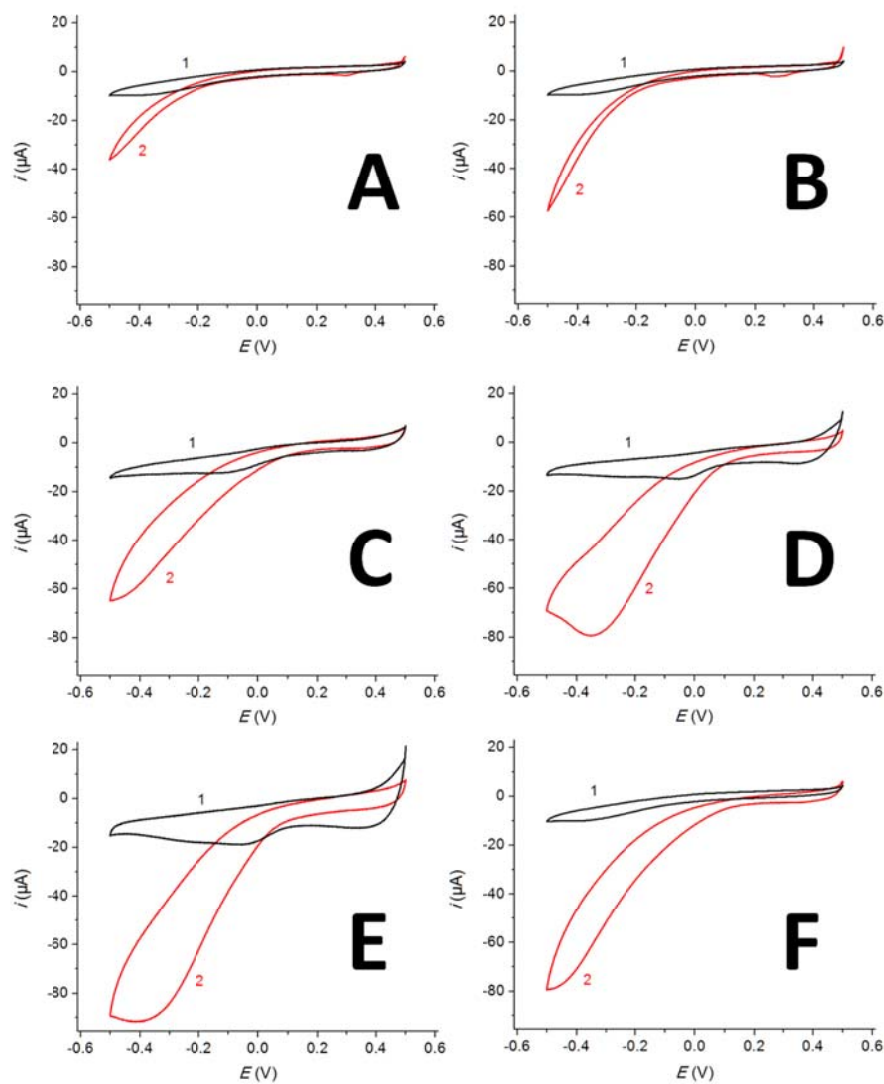


Figura 8.78. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0, empleando electrodos de carbono vitrificado modificados con Au-NB0 (A), Au-NB50 (B), Au-NB100 (C), Au-NB150 (D), Au-NB200 (E) y Au-NB300 (F), en ausencia (1) y presencia de H_2O_2 100 μ M (2). Velocidad de barrido: 50 mV/s.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Para realizar estos estudios se prepararon electrodos de carbono vitrificado modificados con los nanohíbridos, los cuales fueron evaluados en presencia y ausencia de H_2O_2 . En la **Figura 8.78** se muestran los voltamogramas obtenidos en estos estudios.

En disoluciones sin H_2O_2 no se observó la ocurrencia de transformaciones electroquímicas relevantes. En este sentido, solo se apreció la aparición de un pequeño pico catódico alrededor de -80 mV en los voltamogramas adquiridos con los electrodos modificados con los nanohíbridos Au-NB100 – Au-NB300. Esta pequeña transformación puede estar asociada a la reducción de los iones de plata no coordinados en la estructura polimérica, así como a la posible reducción de las moléculas de oxígeno presentes en la disolución.

Por el contrario, los voltamperogramas cíclicos medidos en disoluciones de H_2O_2 mostraron altos valores de corriente catódica, lo cual permite sugerir que este analito se transforma fácilmente sobre la superficie de los electrodos nanoestructurados. Se observó además que las propiedades electrocatalíticas de estos nanomateriales estaban condicionadas por la presencia y concentración de nanopartículas de oro bifuncionalizadas, mostrando mayores valores de corriente de reducción catódica y menores valores de potencial de reducción con el aumento de la cantidad de nanopartículas de oro en los nanohíbridos. Este resultado concuerda con lo descrito en investigaciones previas, donde se demuestra la capacidad de las nanopartículas de oro de descomponer electrocatalíticamente el H_2O_2 [Ju y Chen, 2015; Maji *et al.*, 2014].

En general, las mejores propiedades electrocatalíticas frente al H_2O_2 fueron mostradas por el electrodo modificado con el nanohíbrido Au-NB200. Por tal motivo, se seleccionó este nanomaterial para el desarrollo posterior de sistemas de detección (bio)electroanalíticas.

8.4.3. Ensamblaje de un electrodo enzimático de peroxidasa de tercera generación.

El nanohíbrido Au-NB200 fue empleado como material de recubrimiento de electrodos de carbono vítreo, sobre los cuales se inmovilizó la enzima peroxidasa mediante

8. RESULTADOS Y DISCUSION

entrecruzamiento con glutaraldehído. Este electrodo enzimático fue utilizado en la construcción de biosensor para H_2O_2 para el cual no se necesitó emplear mediadores electroquímicos. Mediante esta estrategia se esperaba lograr un efecto sinérgico entre la capacidad electrocatalítica del nanohíbrido y la especificidad y propiedades catalíticas de la enzima, en aras de lograr un dispositivo analítico altamente sensible, capaz de detectar H_2O_2 a muy bajas concentraciones. Una representación esquemática de este proceso de ensamblaje del electrodo enzimático se muestra en la **Figura 8.79**.

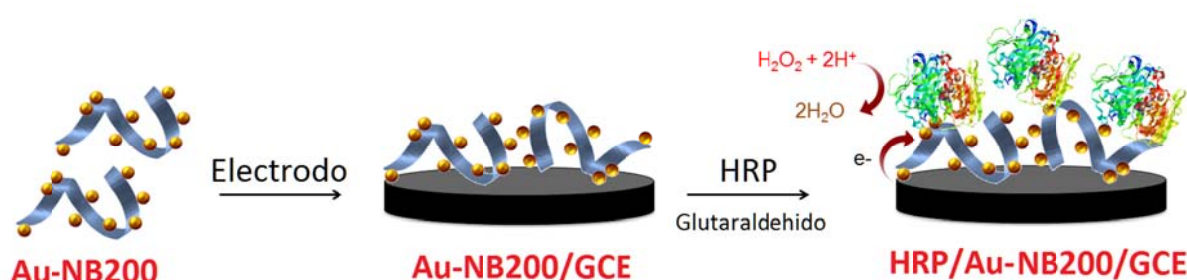


Figura 8.79. Representación esquemática del proceso de construcción del electrodo enzimático.

8.4.3.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje.

Los parámetros experimentales involucrados en la construcción del electrodo enzimático fueron optimizados, tomando como variable respuesta la señal analítica obtenidas mediante amperometría en disoluciones agitadas tras la adición de H_2O_2 . Cada experimento de optimización descrito en esta sección fue realizado por triplicado.

En primer lugar se optimizó la cantidad de nanohíbrido depositada sobre la superficie del electrodo, y los resultados de estos experimentos de optimización se muestran en la **Figura 8.80**.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

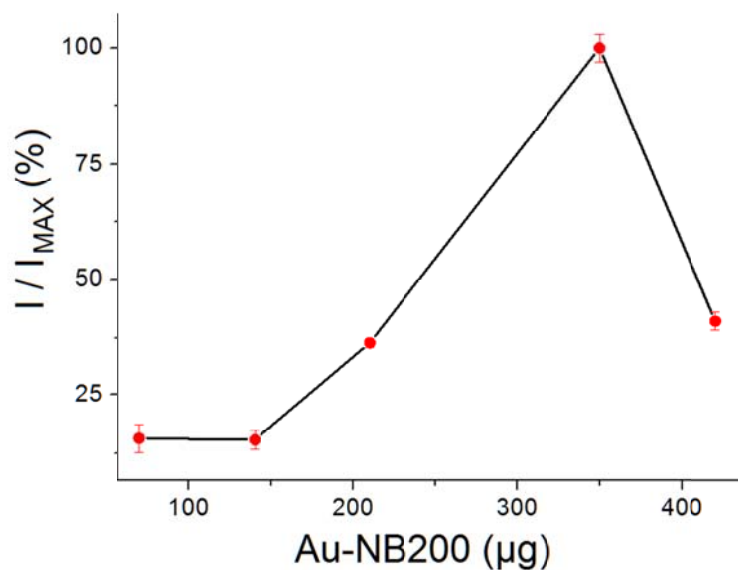


Figura 8.80. Influencia de la cantidad de nanohíbrido Au-NB200 sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H_2O_2 1.0 μM . $E_{op} = -100$ mV vs Ag/AgCl.

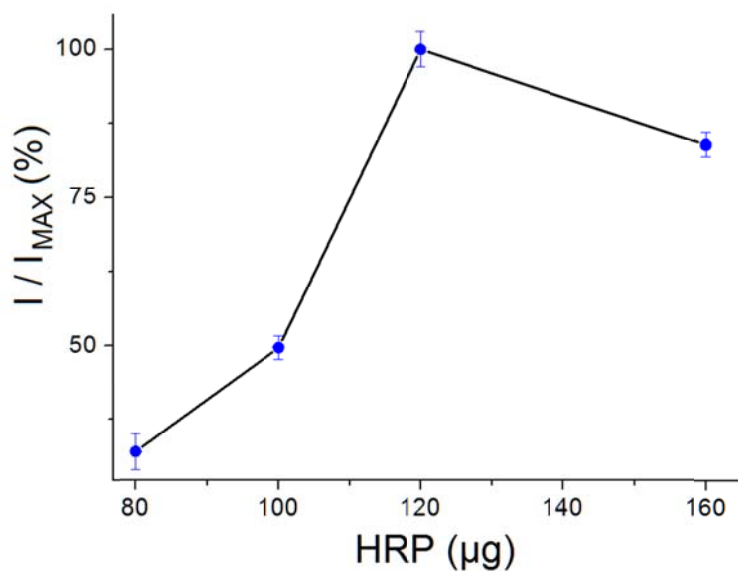


Figura 8.81. Influencia de la cantidad de enzima sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H_2O_2 1.0 μM . $E_{op} = -100$ mV vs Ag/AgCl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

La intensidad de corriente medida a -100 mV (vs. Ag/AgCl) mostró un valor máximo en los electrodos enzimáticos construidos con 350 μg del nanohíbrido, por lo cual se empleó esta cantidad como valor óptimo para modificar las superficies electrónicas en estudios posteriores.

En la **Figura 8.81** se muestra el efecto de la cantidad de peroxidasa sobre la respuesta amperométrica del electrodo. La respuesta analítica aumentó inicialmente con el aumento de la concentración de enzima empleada, hasta alcanzar un valor máximo para electrodos funcionalizados con 120 μg de peroxidasa. Dado el hecho que los electrodos construidos con mayor contenido de enzima mostraron menor valor de señal amperométrica, los electrodos empleados en experimentos posteriores fueron ensamblados con 120 μg de enzima.

8.4.3.2. Caracterización del electrodo enzimático.

El proceso de ensamblaje del electrodo enzimático fue estudiado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. En la **Figura 8.82** se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos en estas mediciones.

Para la interpretación de los resultados, los datos experimentales obtenidos en estas mediciones fueron ajustados a un modelo de circuito equivalente de Randles. El recubrimiento del electrodo con el nanomaterial híbrido (curva b) provocó un aumento en el diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist, lo cual refleja un incremento en la resistencia de los procesos de transferencia de carga interfaciales de $R_{\text{TC}} = 186 \Omega$ a $R_{\text{TC}} = 595 \Omega$). Este fenómeno puede justificarse por las propiedades no conductoras del nanomaterial.

Por otra parte, el diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist también aumentó tras la inmovilización covalente de la enzima (curva c), lo cual reflejó un incremento en la resistencia de los procesos de transferencia de carga en esta superficie biofuncionalizada ($R_{\text{TC}} = 793 \Omega$). Este hecho se justifica por las propiedades no conductoras de las moléculas

8. RESULTADOS Y DISCUSION

proteicas, y sugiere una alta densidad de moléculas de enzima distribuidas sobre la superficie nanoestructurada del electrodo.

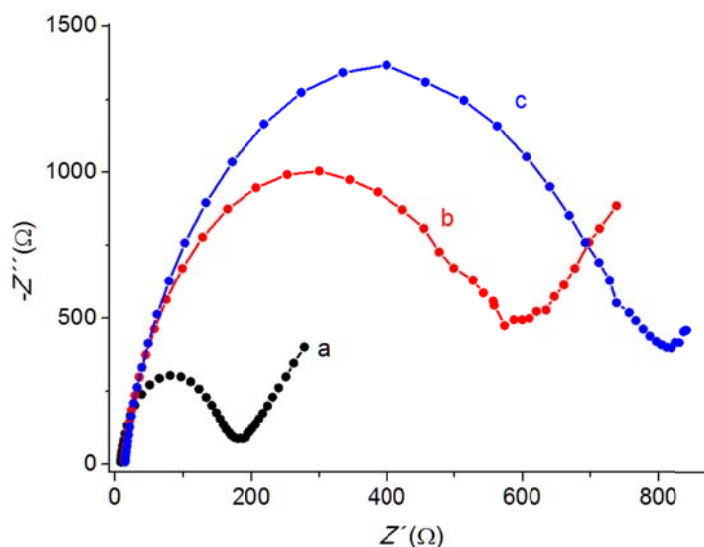


Figura 8.82. Diagramas de Nyquist obtenidos con un electrodo de carbono vitrificado antes (a) y después de su modificación secuencial con el nanohíbrido Au-NB200 (b) y peroxidasa (c). Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1).

El comportamiento del electrodo enzimático HRP/Au-NB200/GCE frente al H_2O_2 fue estudiado mediante voltamperometría cíclica. Como control se preparó un electrodo con este mismo nanomaterial pero sin la enzima (Au-NB200/GCE). Asimismo, se prepararon electrodos controles adicionales con el nanohíbrido sin nanopartículas de oro, con (HRP/Au-NB0/GCE) y sin enzima (Au-NB0/GCE). Los resultados de estos análisis se muestran en la **Figura 8.83**.

En todos los casos se comprobó un notable aumento de los valores de corriente catódica tras la adición de H_2O_2 , lo cual está relacionado con la reducción de este compuesto sobre la superficie de los electrodos. Este hecho confirma la actividad electrocatalítica frente al H_2O_2 de los nanohíbridos preparados, en concordancia con lo descrito en secciones anteriores.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

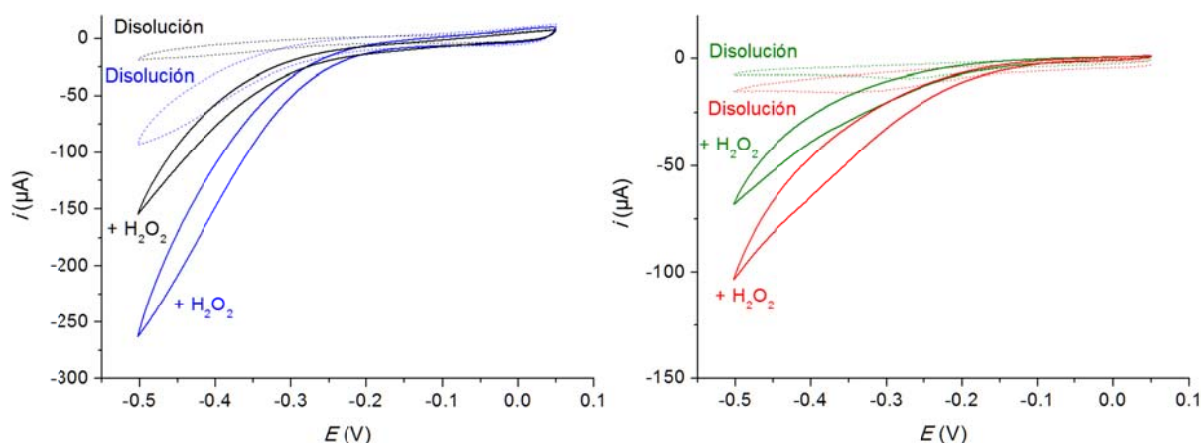


Figura 8.83. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 6.0, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, empleando electrodos de HRP/Au-NB200/GCE (líneas azules), Au-NB200/GCE (líneas negras), Au-NB0/GCE (líneas verdes) y HRP/Au-NB0/GCE (líneas rojas) en ausencia (líneas de puntos) y presencia (líneas continuas) de H_2O_2 3.0 nM.

Como era de esperar, se observó un mayor aumento en los valores de corriente catódica para los electrodos biofuncionalizados con la enzima, sugiriendo un efecto sinérgico entre la capacidad catalítica de la peroxidasa y la de los nanohíbridos. Este efecto fue mayor en el caso del electrodo HRP/Au-NB200/GCE, lo cual refleja tanto la mayor capacidad electrocatalítica del nanohíbrido dopado con nanopartículas de oro como su idoneidad como soporte para la inmovilización de la enzima, favoreciendo una eficiente transferencia electrónica entre el centro activo de la peroxidasa y la superficie del electrodo.

8.4.3.3. Optimización de las condiciones experimentales de medida.

En este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de trabajo a emplear en las mediciones electroanalíticas con el electrodo enzimático HRP/Au-NB200/GCE. En la **Figura 8.84** se muestra la influencia del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre -200 mV y 50 mV vs Ag/AgCl, sobre los valores de la señal amperométrica medida con los

8. RESULTADOS Y DISCUSION

electrodos en disolución de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H_2O_2 1.0 μM .

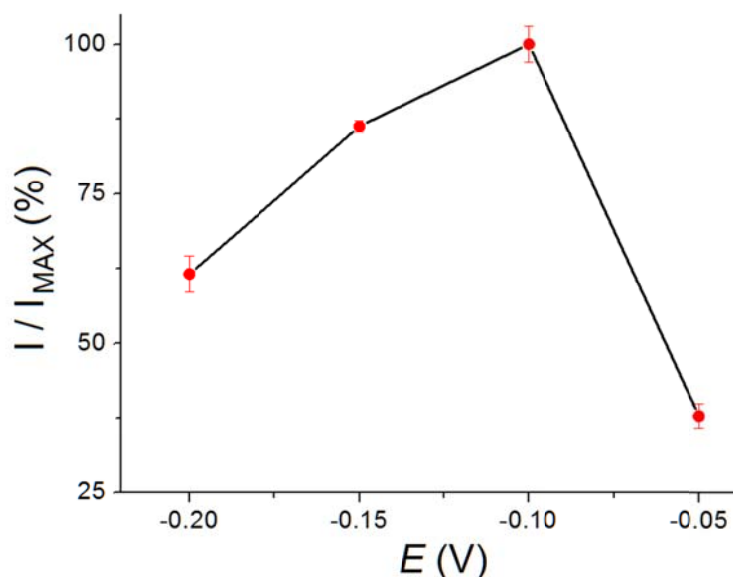


Figura 8.84. Influencia del potencial de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, tras la adición de 10 μL de H_2O_2 1.0 μM .

Como puede apreciarse, los mayores valores de señal analítica fueron obtenidos en los experimentos donde se aplicó un potencial de trabajo de -100 mV, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

En la **Figura 8.85** se muestra el perfil de respuesta amperométrica de los electrodos enzimáticos frente a H_2O_2 , en función del pH de la solución de medida. Estos experimentos fueron realizados utilizando como potencial de trabajo -100 mV vs Ag/AgCl, y empleando disoluciones reguladoras de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

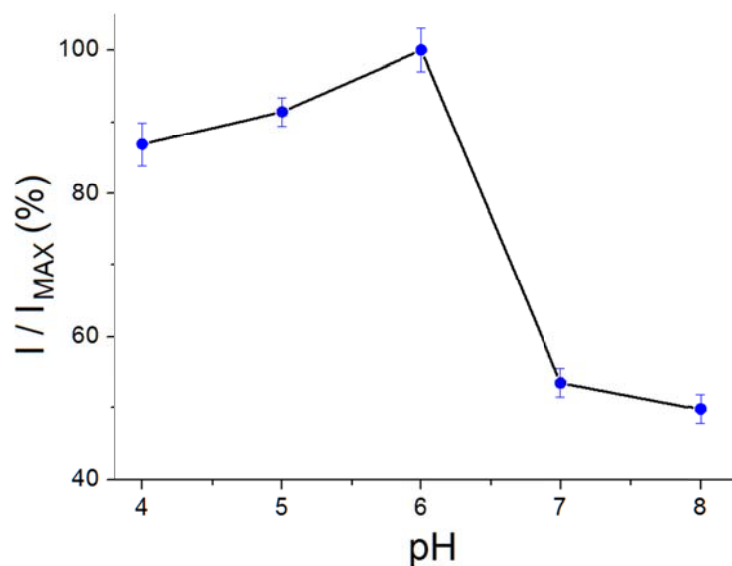


Figura 8.85. Influencia del pH de trabajo sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a diferentes valores de pH, tras la adición de 10 μL de H_2O_2 1.0 μM . $E_{apl} = -0.10$ V vs Ag/AgCl.

Los mejores resultados analíticos se obtuvieron en los experimentos donde la medición se realizó a pH 6.0, por lo cual este valor fue tomado como óptimo para la realización de mediciones posteriores.

8.4.4. Características analíticas del biosensor.

8.4.4.1. Curva de calibración y rango lineal.

El electrodo enzimático preparado fue empleado en la construcción de un biosensor amperométrico para H_2O_2 , empleando las condiciones experimentales de medida previamente optimizadas. En la **Figura 8.86** se ha representado la variación de la corriente medida con el biosensor enzimático tras sucesivas adiciones de este analito.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

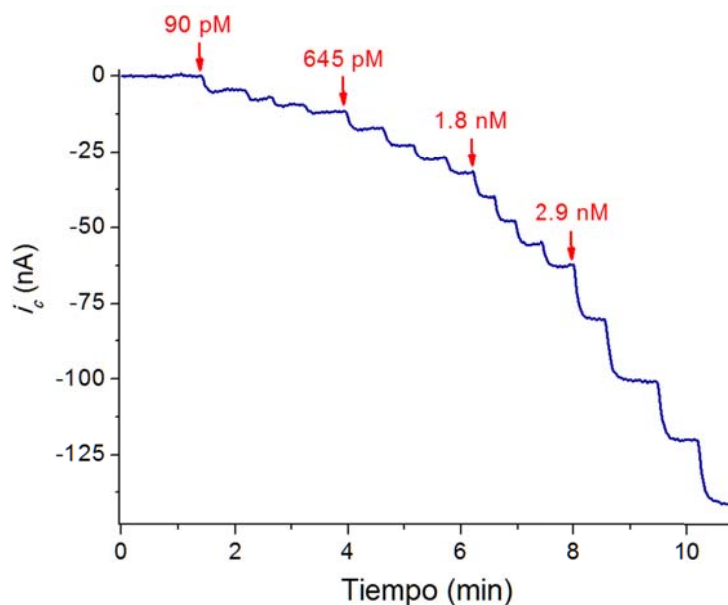


Figura 8.86. Curva de intensidad de corriente vs tiempo obtenida con el biosensor enzimático para adiciones sucesivas de H₂O₂ en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

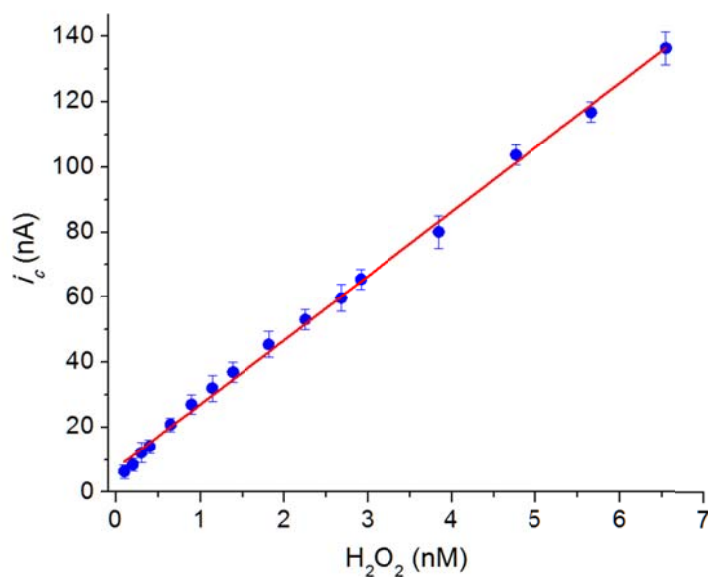


Figura 8.87. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de H₂O₂ empleando el biosensor enzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

El biosensor presentó una rápida respuesta analítica tras la adición de H₂O₂, obteniéndose el 95% de la corriente en el estado estacionario solo 7 segundos después de la adición de catecol.

Los valores de intensidad de corriente vs concentración de H₂O₂ obtenidos en estos experimentos fueron empleados para la construcción de la curva de calibración del biosensor. La curva promedio resultante de estos estudios se muestra en la **Figura 8.87**.

El biosensor presentó un comportamiento lineal de la respuesta amperométrica frente al analito en un intervalo de concentraciones comprendido entre 90 pM y 6.5 nM ($n = 10$, $r = 0.998$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i_c, A = 17.7 \times [H_2O_2], M + 9.0 \times 10^{-9}$$

Aunque el intervalo lineal obtenido fue relativamente corto, de solo 2 órdenes de magnitud, destaca que se localiza en valores de concentraciones muy bajos. Esto permite emplear el biosensor en la determinación de H₂O₂ a niveles de concentración del orden picomolar y nanomolar, lo cual es una ventaja analítica muy importante.

8.4.4.2. Sensibilidad del biosensor.

La sensibilidad del biosensor frente al H₂O₂ se determinó como la pendiente de la curva promedio de calibrado entre el área electroactiva del electrodo. El valor obtenido fue de 283 A/M·cm², lo cual representa un valor muy alto de sensibilidad, en comparación con la descrita en la literatura para otros biosensores nanoestructurados (**Tabla 8.7**).

Por otra parte, la sensibilidad calculada para este biosensor, sin considerar el valor de área electroactiva del electrodo, fue de 17.7 A/M.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4.4.3. Límite de detección del biosensor.

El límite de detección del biosensor, calculado de acuerdo con el criterio $3 \cdot SD/m$ como se describe anteriormente para los otros biosensores incluidos en este trabajo, fue de 45 pM (n=10). Como puede apreciarse de la comparación con los datos descritos en la **Tabla 8.7**, el biosensor presentó un límite de detección extremadamente bajo.

Tabla 8.7. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de peroxidasa para H_2O_2 .

Electrodo	<i>E</i> (mV)	Rango Lineal (mM)	Sensibilidad (A/M·cm ²)	LD (M)	Referencia
HRP/polyAuNP/Au	0	$5 \cdot 10^{-3}$ - 1.1	$4.9 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	[Villalonga <i>et al.</i> , 2011]
HRP/pcAu	-50	$1 \cdot 10^{-4}$ - $4.0 \cdot 10^{-2}$	1.4	$1.0 \cdot 10^{-8}$	[Ferapontova <i>et al.</i> , 2001]
HRP/C-Dots/LDHs/GCE	-350	0.1 - 23	$5.5 \cdot 10^{-2}$	$4.0 \cdot 10^{-8}$	[Wang <i>et al.</i> , 2015]
HRP/ZnO-AuNP-NF/GCE	-300	0.015 - 1.1	-	$9 \cdot 10^{-6}$	[Xiang <i>et al.</i> , 2009]
HRP/AuNP/GF/CS/GCE	-300	$5 \cdot 10^{-3}$ - 5.13	-	$1.7 \cdot 10^{-6}$	[Zhou <i>et al.</i> , 2010]
HRP/CaCO ₃ -AuNP/Au	-200	$5 \cdot 10^{-4}$ - 5.2	-	$1 \cdot 10^{-7}$	[Li <i>et al.</i> , 2010]
HRP/AuNP-SF/GCE	-600	0.01 - 1.8	-	$5 \cdot 10^{-6}$	[Yin <i>et al.</i> , 2009]
HRP-AuNP/ALG/Au	-400	0.02 - 13.7	$4.0 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-6}$	[Chico <i>et al.</i> , 2009]
HRP/AuNP/ITO	-150	$8 \cdot 10^{-3}$ - 3.0	-	$2 \cdot 10^{-6}$	[Wang <i>et al.</i> , 2009]
HRP/Au-NB200/GCE	-100	$9 \cdot 10^{-8}$ - $6.5 \cdot 10^{-6}$	283	$4.5 \cdot 10^{-11}$	Presente trabajo

HRP: Peroxidasa de rábano; **polyAuNP:** nanopartículas de oro electropolimerizadas; **AuNP:** nanopartículas de oro; **pcAu:** electrodo de oro policristalino; **C-Dots:** puntos cuánticos de carbono; **LDHs:** hidróxidos laminados de CoFe; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **NF:** Nafión; **GF:** grafeno; **CS:** quitosano; **SF:** fibroina de seda; **ALG:** alginato de sodio; **ITO:** electrodo de óxido de indio-estaño.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Estas excelentes propiedades analíticas del biosensor pueden estar propiciadas por la combinación sinérgica entre las propiedades catalíticas de la enzima y la capacidad electrocatalítica mostrada por el nanohíbrido Au-NB200.

8.4.4.4. Parámetros cinéticos del biosensor enzimático.

Las constantes cinéticas aparentes $K_{M(ap)}$ e $I_{MAX(ap)}$ de este biosensor fueron determinadas empleando el método gráfico de Lineweaver-Burk. Los valores calculados para estos parámetros cinéticos fueron $K_{M(ap)} = 11$ mM e $I_{MAX(ap)} = 1.0$ μ A.

8.4.4.5. Repetitividad de las medidas.

Para determinar la repetitividad entre las medidas obtenidas con el biosensor, se midieron las señales amperométricas frente a H_2O_2 100 pM. Estas mediciones se realizaron 10 veces empleando el mismo biosensor enzimático. La desviación estándar relativa de estas mediciones (R.S.D.) fue de 4.9%, lo cual refleja la buena repetitividad de las medidas llevadas a cabo con el biosensor.

8.4.4.6. Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

La reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor enzimático se determinó midiendo la respuesta amperométrica de 5 biosensores, fabricados de la misma manera, frente a H_2O_2 1 nM. La RSD calculada para estos biosensores fue de 7.4%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena reproducibilidad del proceso de construcción del biosensor enzimático.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.4.4.7. Interferencias.

En este trabajo se evaluó la influencia de diferentes compuestos químicos con potencial efecto interferente, sobre la medida del biosensor. Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de H₂O₂ de concentración 2.0 nM, en ausencia y presencia de potenciales compuestos interferentes a concentraciones de 1 μM.

Como resultado de estos experimentos no se observó ningún efecto interferente para disoluciones 1 μM de D-glucosa, etanol, ácido acético, D-sacarosa, ácido láctico, ácido cítrico y ácido úrico. Debe destacarse que solo se observó un incremento del 7% en el valor de corriente catódica en estas mediciones en presencia de ácido ascórbico 1 μM. Estos resultados nos permiten concluir que las mediciones obtenidas con el biosensor enzimático construido no son sensiblemente afectadas por los citados compuestos.

8.4.4.8. Tiempo de vida útil del biosensor.

Para determinar la estabilidad de almacenamiento del biosensor enzimático, se prepararon 4 electrodos según el protocolo propuesto. Estos electrodos fueron almacenados a 4 °C en condiciones de sequedad. Los electrodos fueron periódicamente evaluados mediante la determinación de su respuesta amperométrica frente a H₂O₂ 2 nM.

En la **Figura 8.88** se muestra la influencia del tiempo de incubación sobre la respuesta analítica normalizada de estos biosensores. El biosensor enzimático mostró una excelente estabilidad de almacenamiento en disoluciones de fosfato de sodio, reteniendo el 96% y 78% de su actividad electrocatalítica tras 15 y 30 días de almacenamiento a 4°C.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

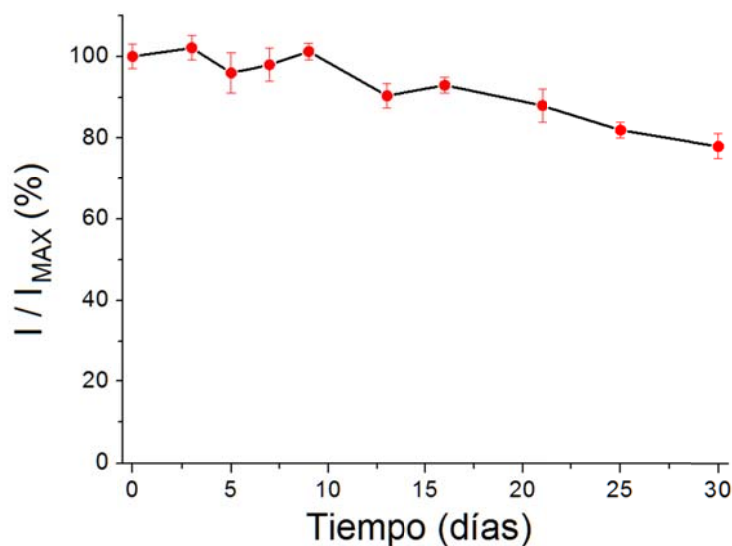


Figura 8.88. Influencia del tiempo de almacenamiento a 4°C, en solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5 (A) o en condiciones de sequedad (B), sobre la respuesta amperométrica normalizada del biosensor.

8.4.5. Preparación y caracterización de otros (bio)sensores electroquímicos nanoestructurados con Au-NB200.

El nanohíbrido Au-NB200 fue evaluado como elemento de transducción para la construcción de otras plataformas electroanalíticas, tomando en consideración su actividad catalítica frente a H_2O_2 . En este sentido, se desarrolló inicialmente un sensor amperométrico para la determinación de H_2O_2 , empleando electrodos modificados con 350 μg de este nanomaterial.

En la **Figura 8.89** se muestra la curva de calibración obtenida con este electrodo tras adiciones sucesivas de H_2O_2 , empleando un potencial de trabajo de -100 mV. El electrodo nanoestructurado mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones de H_2O_2 entre 10 μM y 480 μM , con una sensibilidad de 503 $\mu A/M$.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

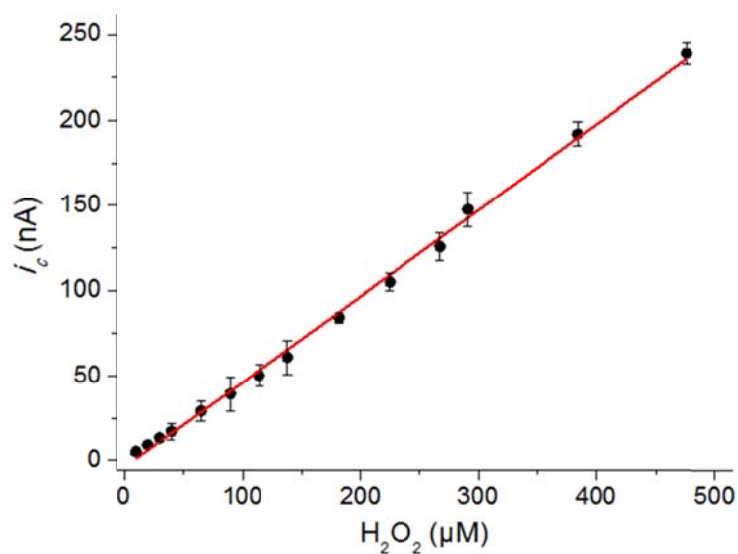


Figura 8.89. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de H₂O₂ empleando el electrodo nanoestructurado Au-NB200/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

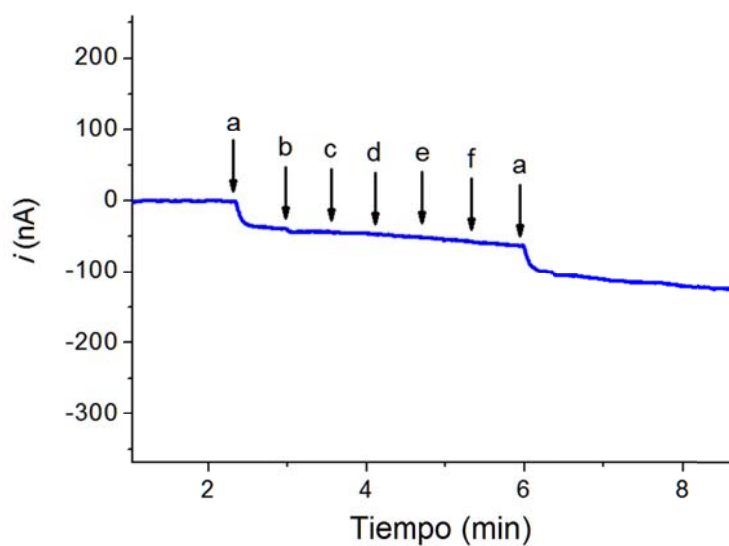


Figura 8.90. Respuesta amperométrica del electrodo nanoestructurado con Au-NB200 frente a H₂O₂ (a), ácido ascórbico (b), ácido úrico (c), D-glucosa (d), L-tirosina (e) y D-sacarosa (f) 100 μM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Este sensor mostró una alta especificidad, no siendo afectada su respuesta analítica frente a H_2O_2 100 μM en presencia de concentraciones similares de D-glucosa, ácido úrico, L-tirosina y D-sacarosa (**Figura 8.90**). Por otra parte, la señal analítica del sensor electroquímico ensamblado solo fue ligeramente afectada en un 8% en presencia de ácido ascórbico.

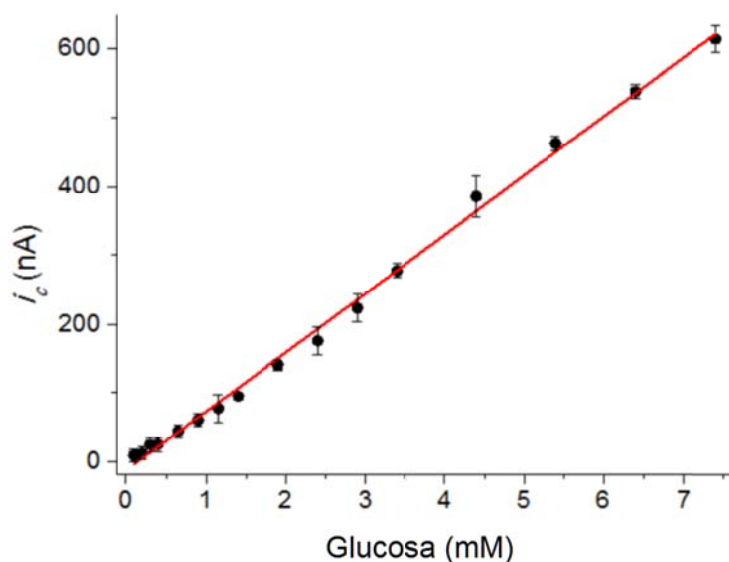


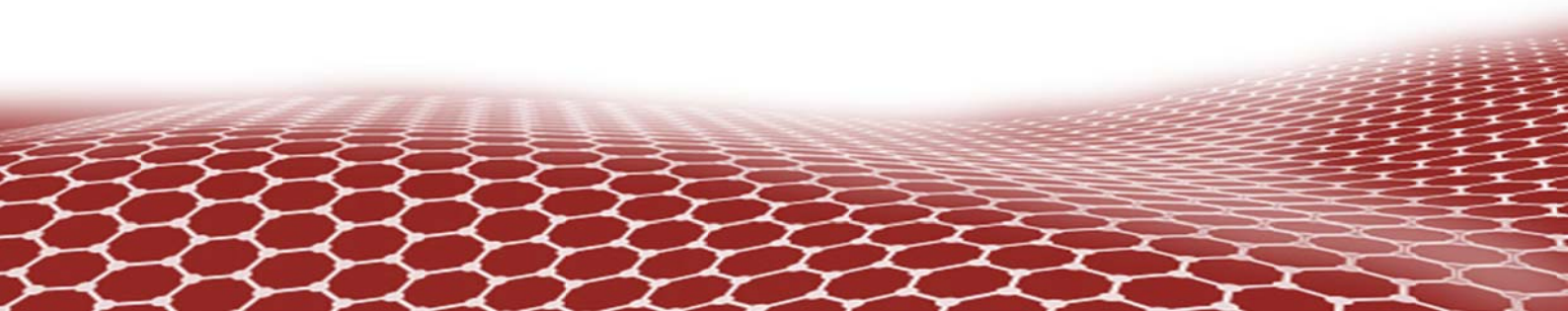
Figura 8.91. Curva de calibrado obtenida con el electrodo Au-NB200/GCE funcionalizado con glucosa oxidasa para la detección amperométrica de D-glucosa en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0. $E_{ap} = -100$ mV vs Ag/Ag/Cl.

Esta interfaz fue posteriormente evaluada como soporte para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa, con el objetivo de detectar D-glucosa por métodos amperométricos. Para ello, 100 μg de la enzima fueron inmovilizados sobre la superficie del electrodo nanoestructurado empleando glutaraldehído como agente entrecruzante.

En la **Figura 8.91** se muestra la curva de calibración obtenida con este electrodo enzimático tras adiciones sucesivas de D-glucosa, empleando un potencial de trabajo de -100 mV. El biosensor nanoestructurado mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones de D-glucosa entre 100 μM y 7.4 mM, con una sensibilidad de 85 $\mu\text{A}/\text{M}$.

9

CONCLUSIONES



9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, los cuales han sido descritos en la memoria de la Tesis Doctoral, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La modificación covalente del óxido de grafeno con alcoxisilanos permite la incorporación de grupos reactivos sobre la superficie del nanomaterial sin afectar sensiblemente sus propiedades estructurales y electroconductoras. Estos grupos reactivos pueden ser posteriormente empleados como centros de anclaje para la modificación del nanomaterial con nanopartículas metálicas o polisacáridos iónicos. Esta Tesis Doctoral se utilizó esta estrategia para la preparación de dos nanohíbridos de óxido de grafeno modificado con: *i)* el polisacárido glicolquitosano, y *ii)* nanopartículas de oro funcionalizadas con brochas de dextrano. Estos nanohíbridos presentaron alta densidad de grupos funcionales hidrofílicos, los cuales les confirieron capacidad de dispersión en soluciones acuosas, y favorecieron su uso como soporte para la inmovilización de enzimas sobre la superficie de electrodos.
2. Los nanohíbridos de óxido de grafeno preparados fueron empleados como elementos de transducción para el diseño de dos biosensores enzimáticos para la detección amperométrica de compuestos fenólicos. Con el nanohíbrido de óxido de grafeno-glicolquitosano se construyó un biosensor para la determinación simultánea de compuestos fenólicos, mediante inmovilización covalente de la enzima lacasa. El nanohíbrido de óxido de grafeno modificado con nanopartículas de oro y dextrano se utilizó en el diseño de un biosensor para catecol, mediante la inmovilización covalente de la enzima tirosinasa. Ambos biosensores presentaron excelentes propiedades analíticas y de estabilidad.
3. Se prepararon nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa mediante una estrategia de enmascaramiento y modificación superficial selectiva. Este nanohíbrido fue empleado como soporte para la co-inmovilización sitio-selectiva de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa en cada cara de la nanopartícula. Las nanopartículas Janus bifuncionalizadas fueron empleadas en el diseño de un biosensor amperométrico para D-glucosa, el cual mostró alta sensibilidad y estabilidad, bajo

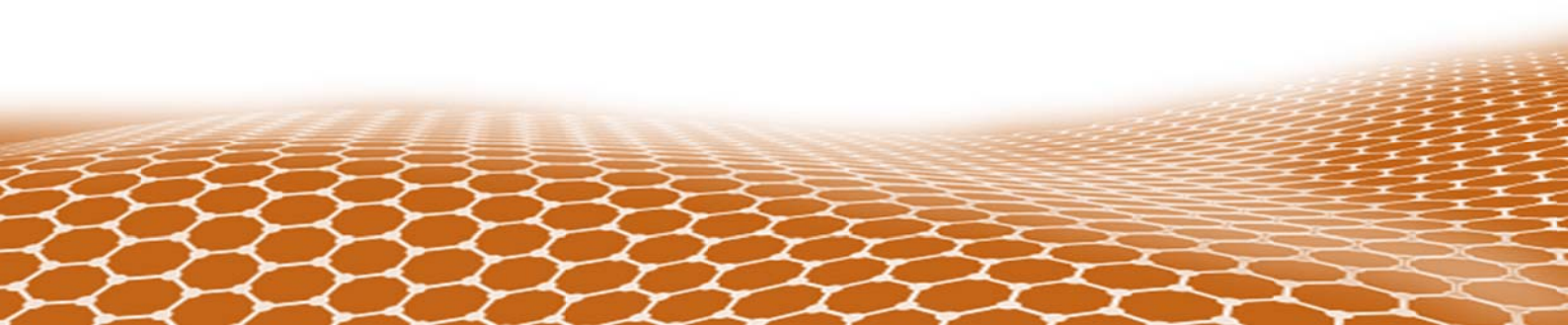
9. CONCLUSIONES

límite de detección, buena reproducibilidad, y un rápido tiempo de respuesta. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la utilidad de este nuevo nanomaterial anisotrópico para la preparación y desarrollo de biosensores bienzimáticos.

4. Se prepararon nuevos nanomateriales híbridos basados en polímeros de coordinación de Ag-bipiridina, decorados con nanopartículas de oro bifuncionalizadas. Se demostró que estos nuevos nanomateriales se comportaban como enzimas artificiales con actividad tipo peroxidasa, y que tanto su actividad catalítica como su morfología podía manipularse racionalmente variando el contenido de nanopartículas de oro. El nanohíbrido con mejores propiedades electrocatalíticas fue empleado para la construcción de un biosensor enzimático para H_2O_2 mediante la inmovilización de la enzima peroxidasa. Asimismo, este nanohíbrido fue utilizado como elemento catalítico para el diseño de un sensor electroquímico para H_2O_2 y un biosensor de glucosa oxidasa para la determinación amperométrica de D-glucosa.
5. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad electroanalítica de los biosensores nanoestructurados desarrollados, los cuales mostraron bajos valores de desviación estándar relativa para la repetibilidad de las medidas y la reproducibilidad inter-electrodo, lo que demuestra la fiabilidad de los procesos de fabricación. Varios de los sistemas biosensores desarrollados fueron validados en la determinación analítica de compuestos de interés alimenticio en muestras reales.

10

REFERENCIAS



10. REFERENCIAS

- Agarwal, A. K., Kadu, M. S., Pandhurnekar, C. P., Muthreja, I. L. (2016). Brunauer-Emmett-Teller (BET), Langmuir and Freundlich isotherm studies for the adsorption of nickel ions onto coal fly ash. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution* **13**: 49-53.
- Ahmadi, M., Elmongy, H., Madrakian, T., Abdel-Rehim, M. (2016). Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. *Analytica Chimica Acta* **958**: 1-21.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* **2**: 875-877.
- Akyilmaz, E., Şahin, B., Türkmen, H. (2014). A palladium complex mediated laccase biosensor and sensitive voltammetric analysis of catechol. *Sensor Letters* **12**: 1519-1525.
- Alibolandi, M., Mohammadi, M., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., Abnous, K. (2017). Fabrication of aptamer decorated dextran coated nano-graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **155**: 218-229.
- Allen, M. J., Tung, V. C., Kaner, R. B. (2010). Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chemical Reviews* **110**: 132-145.
- Alves, N. M., Mano, J. F. (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **43**: 401-414.
- Ambrosi, A., Pumera, M. (2016). Electrochemically exfoliated graphene and graphene oxide for energy storage and electrochemistry applications. *Chemistry – A European Journal* **22**: 153-159.
- Amine, A., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G. (2016). Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* **76**: 180-194.
- Araby, S., Meng, Q., Zhang, L., Zaman, I., Majewski, P., Ma, J. (2015). Elastomeric composites based on carbon nanomaterials. *Nanotechnology* **26**: 112001.

10. REFERENCIAS

- Araque, E., Arenas, C. B., Gamella, M., Reviejo, J., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2014a). Graphene-polyamidoamine dendrimer-Pt nanoparticles hybrid nanomaterial for the preparation of mediatorless enzyme biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **717**: 96-102.
- Araque, E., Villalonga, R., Gamella, M., Martínez-Ruiz, P., Reviejo, J., Pingarrón, J. M. (2013). Crumpled reduced graphene oxide–polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor. *Journal of Materials Chemistry B* **1**: 2289-2296.
- Araque, E., Villalonga, R., Gamella, M., Martínez-Ruiz, P., Sánchez, A., García-Baonza, V., Pingarrón, J. M. (2014b). Water-soluble reduced graphene oxide–carboxymethylcellulose hybrid nanomaterial for electrochemical biosensor design. *ChemPlusChem* **79**: 1334-1341.
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Palleschi, G., Piermarini, S., Ricci, F., Volpe, G. (2016). Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**: 114-126.
- Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* **28**: 1-12.
- Artiles, M. S., Rout, C. S., Fisher, T. S. (2011). Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**: 1352-1360.
- Baby, T. T., Aravind, S. J., Arockiadoss, T., Rakhi, R. B., Ramaprabhu, S. (2010). Metal decorated graphene nanosheets as immobilization matrix for amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **145**: 71-77.
- Baptista-Pires, L., Pérez-López, B., Mayorga-Martinez, C. C., Morales-Narváez, E., Domingo, N., Esplandiu, M. J., Alzina, F., Sotomayor-Torres, C. M., Merkoçi, A. (2014). Electrocatalytic tuning of biosensing response through electrostatic or hydrophobic enzyme–graphene oxide interactions. *Biosensors and Bioelectronics*, *61*, 655-662.

10. REFERENCIAS

- Barrett, E. P., Joyner, L. G., Halenda, P. P. (1951). The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society* **73**: 373-380.
- Barrington, D. J., Reichwaldt, E. S., Ghadouani, A. (2013). The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems. *Ecological Engineering* **50**: 86-94.
- Bartlett, P. N., Whitaker, R. G. (1987). Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes. *Biosensors* **3**: 359-379.
- Berciaud, S., Ryu, S., Brus, L. E., Heinz, T. F. (2008). Probing the intrinsic properties of exfoliated graphene: Raman spectroscopy of free-standing monolayers. *Nano Letters* **9**: 346-352.
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews* **43**: 744-764.
- Bollag, J. M., Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 849-854.
- Borisova, B., Ramos, J., Díez, P., Sánchez, A., Parrado, C., Araque, E., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2015). A layer-by-layer biosensing architecture based on polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-modified graphene oxide. *Electroanalysis* **27**: 2131-2138.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* **60**: 309-319.
- Byun, K. E., Choi, D. S., Kim, E., Seo, D. H., Yang, H., Seo, S., Hong, S. (2011). Graphene-polymer hybrid nanostructure-based bioenergy storage device for real-time control of biological motor activity. *ACS Nano* **5**: 8656-8664.
- Cai, D., Song, M. (2010). Recent advance in functionalized graphene/polymer nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry* **20**: 7906-7915.

10. REFERENCIAS

- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* **63**: 125-132.
- Carreño-Gómez, B., Duncan, R. (1997). Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* **148**: 231-240.
- Chaiyasan, W., Praputbut, S., Kompella, U. B., Srinivas, S. P., Tiyaboonchai, W. (2017). Penetration of mucoadhesive chitosan-dextran sulfate nanoparticles into the porcine cornea. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **149**: 288-296.
- Chauhan, B. P. (2011). Hybrid nanomaterials: Synthesis, characterization, and applications. *John Wiley & Sons, New York*.
- Chen, C., Hong, X., Xu, T., Chen, A., Lu, L., Gao, Y. (2016). Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto a poly (aniline-co-N-methylthionine) film. *Synthetic Metals* **212**: 123-130.
- Chen, K. J., Lee, C. F., Rick, J., Wang, S. H., Liu, C. C., Hwang, B. J. (2012a). Fabrication and application of amperometric glucose biosensor based on a novel PtPd bimetallic nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotube catalyst. *Biosensors and Bioelectronics* **33**: 75-81.
- Chen, W., Cai, S., Ren, Q. Q., Wen, W., Zhao, Y. D. (2012b). Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review. *Analyst* **137**: 49-58.
- Chen, X., Li, D., Li, G., Luo, L., Ullah, N., Wei, Q., Huang, F. (2015). Facile fabrication of gold nanoparticle on zein ultrafine fibers and their application for catechol biosensor. *Applied Surface Science* **328**: 444-452.
- Chen, Y., Li, Y., Sun, D., Tian, D., Zhang, J., Zhu, J. J. (2011). Fabrication of gold nanoparticles on bilayer graphene for glucose electrochemical biosensing. *Journal of Materials Chemistry* **21**: 7604-7611.
- Chico, B., Camacho, C., Pérez, M., Longo, M. A., Sanromán, M. A., Pingarrón, J. M., Villalonga, R. (2009). Polyelectrostatic immobilization of gold nanoparticles-modified

10. REFERENCIAS

- peroxidase on alginate-coated gold electrode for mediatorless biosensor construction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **629**: 126-132.
- Cincotto, F. H., Canevari, T. C., Machado, S. A., Sánchez, A., Barrio, M. A. R., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2015). Reduced graphene oxide-Sb₂O₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. *Electrochimica Acta* **174**: 332-339.
 - Clark, L. C., Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**: 29-45.
 - Claussen, J. C., Kumar, A., Jaroch, D. B., Khawaja, M. H., Hibbard, A. B., Porterfield, D. M., Fisher, T. S. (2012). Nanostructuring platinum nanoparticles on multilayered graphene petal nanosheets for electrochemical biosensing. *Advanced Functional Materials* **22**: 3399-3405.
 - Copeland, R. A. (2000) Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 2nd Edition. *John Wiley & Sons, New York*.
 - Cordeiro, C. A., de Vries, M. G., Cremers, T. I. F. H., Westerink, B. H. C. (2016). The role of surface availability in membrane-induced selectivity for amperometric enzyme-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **223**: 679-688.
 - Czaja, A. U., Trukhan, N., Müller, U. (2009). Industrial applications of metal-organic frameworks. *Chemical Society Reviews* **38**: 1284-1293.
 - Danielsen, E. T., Danielsen, E. M. (2017). Glycol chitosan: A stabilizer of lipid rafts in the intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* **1859**: 360-367.
 - De Groot, C. J., Van Luyn, M. J., Van Dijk-Wolthuis, W. N., Cadée, J. A., Plantinga, J. A., Den Otter, W., Hennink, W. E. (2001). In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* **22**: 1197-1203.
 - Dey, R. S., Raj, C. R. (2010). Development of an amperometric cholesterol biosensor based on graphene-Pt nanoparticle hybrid material. *The Journal of Physical Chemistry C* **114**: 21427-21433.

10. REFERENCIAS

- Dhathathreyan, K. S., Rajalakshmi, N., Balaji, R. (2017). Nanomaterials for fuel cell technology. *Nanotechnology for Energy Sustainability* 569-596.
- Díez, P., Piuleac, C. G., Martínez-Ruiz, P., Romano, S., Gamella, M., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2013). Supramolecular immobilization of glucose oxidase on gold coated with cyclodextrin-modified cysteamine core PAMAM G-4 dendron/Pt nanoparticles for mediatorless biosensor design. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**: 3773-3781.
- Díez, P., Sánchez, A., Gamella, M., Martínez-Ruiz, P., Aznar, E., De La Torre, C., Murguía, J. R., Martínez-Máñez, R., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2014). Toward the design of smart delivery systems controlled by integrated enzyme-based biocomputing ensembles. *Journal of the American Chemical Society* **136**: 9116-9123.
- Doherty, A. P., Vos, J. G. (1997). Three-dimensional plots from osmium redox-polymer based electrochemical sensors. *Analytica Chimica Acta* **344**: 159-166.
- Dönmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Yetim, N. K., Arslan, H. (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly (styrene) attached glycine-Pt (IV) for amperometric detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics* **54**: 146-150.
- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* **39**: 228-240.
- Dudchenko, O. Y., Pyeshkova, V. M., Soldatkin, O. O., Akata, B., Kasap, B. O., Soldatkin, A. P., Dzyadevych, S. V. (2016). Development of silicalite/glucose oxidase-based biosensor and its application for glucose determination in juices and nectars. *Nanoscale Research Letters* **11**: 1-7.
- Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'Skaya, A. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *IRBM* **29**: 171-180.
- Eda, G., Chhowalla, M. (2010). Chemically derived graphene oxide: towards large-area thin-film electronics and optoelectronics. *Advanced materials*, **22**(22), 2392-2415.
- Eggins, B. R. (2002) Chemical sensors and biosensors. *John Wiley & Sons, New York*.

10. REFERENCIAS

- El Harrad, L., Amine, A. (2016). Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. *Enzyme and Microbial Technology* **85**: 57-63.
- El Yamani, N., Collins, A. R., Rundén-Pran, E., Fjellsbø, L. M., Shaposhnikov, S., Zielonddiny, S., Dusinska, M. (2017). In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis* **32**: 117-126.
- Elkholly, S. S., Salem, H. A., Eweis, M., Elsabee, M. Z. (2014). Synthesis and characterization of some acyl thiourea derivatives of chitosan and their biocidal activities. *International Journal of Biological Macromolecules* **70**: 199-207.
- Ema, M., Hougaard, K. S., Kishimoto, A., Honda, K. (2016). Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: a literature review. *Nanotoxicology* **10**: 391-412.
- Espín, J. C., Varón, R., Fenoll, L. G., Gilabert, M., García-Ruíz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F. (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry* **267**: 1270-1279.
- Favero, G., Fusco, G., Mazzei, F., Tasca, F., Antiochia, R. (2015). Electrochemical characterization of graphene and mwcnt screen-printed electrodes modified with AuNPs for laccase biosensor development. *Nanomaterials* **5**: 1995-2006.
- Ferapontova, E. E., Grigorenko, V. G., Egorov, A. M., Börchers, T., Ruzgas, T., Gorton, L. (2001). Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 147-157.
- Fernández, M., Villalonga, M. L., Caballero, J., Fragoso, A., Cao, R., Villalonga, R. (2003). Effects of β -cyclodextrin-dextran polymer on stability properties of trypsin. *Biotechnology and Bioengineering* **83**: 743-747.
- Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature* **241**: 20-22.

10. REFERENCIAS

- Fu, J., Qiao, H., Li, D., Luo, L., Chen, K., Wei, Q. (2014). Laccase biosensor based on electrospun copper/carbon composite nanofibers for catechol detection. *Sensors* **14**: 3543-3556.
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* **4**: 1032-1038.
- García, Y., Su, B. L. (2016). Advanced complex inorganic nanomaterials - A new era of Nanotechnology. *European Journal of Inorganic Chemistry* **13-14**: 1903-1905.
- Geddes, C. D., Lakowicz, J. R. (2006) Glucose sensing. *Springer-Verlag, New York*.
- Ghica, M. E., Brett, C. M. (2013). Simple and efficient epinephrine sensor based on carbon nanotube modified carbon film electrodes. *Analytical Letters* **46**: 1379-1393.
- Gómez-Navarro, C., Weitz, R. T., Bittner, A. M., Scolari, M., Mews, A., Burghard, M., Kern, K. (2007). Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets. *Nano Letters* **7**: 3499-3503.
- Gong, C., Chen, J., Song, Y., Sun, M., Song, Y., Guo, Q., Wang, L. (2016). A glucose biosensor based on the polymerization of aniline induced by a bio-interphase of glucose oxidase and horseradish peroxidase. *Analytical Methods* **8**: 1513-1519.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J., Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* **8**: 1400-1458.
- Grisham, M. B., Everse, J. (1991). Prooxidant activity of hemoglobin and myoglobin. *Peroxidases in Chemistry and Biology* **1**: 335-344.
- Guo, M., Wang, H., Huang, D., Han, Z., Li, Q., Wang, X., Chen, J. (2014). Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix. *Science and Technology of Advanced Materials* **15**: 035005.
- Guo, Y., Xu, K., Wu, C., Zhao, J., Xie, Y. (2015). Surface chemical-modification for engineering the intrinsic physical properties of inorganic two-dimensional nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **44**: 637-646.

10. REFERENCIAS

- Guo, Z., Tan, L. (2009) *Fundamentals and Applications of Nanomaterials*. Artech House, Boston
- Gupta, G., Rajendran, V., Atanassov, P. (2003). Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode. *Electroanalysis* **15**: 1577-1583.
- Hao, Y., Wang, Y., Wang, L., Ni, Z., Wang, Z., Wang, R., Koo, C. K., Shen, Z., Thong, J. T. (2010). Probing layer number and stacking order of few-layer graphene by Raman spectroscopy. *Small* **6**: 195-200.
- Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., Hornig, S. (2006). Functional polymers based on dextran. In: *Polysaccharides II*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 199-291.
- Heneka, M. T., Nicotera, P. (2016). Thoughts on obesity and brain glucose. *Cell* **165**: 773-775.
- Hernández-Ibáñez, N., García-Cruz, L., Montiel, V., Foster, C. W., Banks, C. E., Iniesta, J. (2016). Electrochemical lactate biosensor based upon chitosan/carbon nanotubes modified screen-printed graphite electrodes for the determination of lactate in embryonic cell cultures. *Biosensors and Bioelectronics* **77**: 1168-1174.
- Holzinger, M., Le Goff, A., Cosnier, S. (2014). Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Frontiers in Chemistry* **2**: 63.
- Hong, S. K., Kim, C. S., Hwang, W. S., Cho, B. J. (2016). Hybrid integration of graphene analog and silicon complementary metal–oxide–semiconductor digital circuits. *ACS Nano* **10**: 7142-7146.
- Hong, W., Bai, H., Xu, Y., Yao, Z., Gu, Z., Shi, G. (2010). Preparation of gold nanoparticle/graphene composites with controlled weight contents and their application in biosensors. *The Journal of Physical Chemistry C* **114**: 1822-1826.
- Hu, Y., He, L., Ding, J., Sun, D., Chen, L., Chen, X. (2016). One-pot synthesis of dextran decorated reduced graphene oxide nanoparticles for targeted photo-chemotherapy. *Carbohydrate Polymers* **144**: 223-229.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F. O. L. K. E. (1991). Chemical sensors: definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **63**: 1247-1250.

10. REFERENCIAS

- Hummers Jr, W. S., Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society* **80**: 1339-1339.
- Hyun, W. J., Park, O. O., Chin, B. D. (2013). Foldable graphene electronic circuits based on paper substrates. *Advanced Materials* **25**: 4729-4734.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**: 56.
- Iwuoha, E. I., de Villaverde, D. S., Garcia, N. P., Smyth, M. R., Pingarron, J. M. (1997). Reactivities of organic phase biosensors. 2. The amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film. *Biosensors and Bioelectronics* **12**: 749-761.
- Jain, U., Narang, J., Rani, K., Chauhan, N. (2015). Synthesis of cadmium oxide and carbon nanotube based nanocomposites and their use as a sensing interface for xanthine detection. *RSC Advances* **5**: 29675-29683.
- James, S. L. (2003). Metal-organic frameworks. *Chemical Society Reviews* **32**: 276-288.
- Janiak, C. (2003). Engineering coordination polymers towards applications. *Dalton Transactions* **14**: 2781-2804.
- Jesus, R. A., Rabelo, A. S., Figueiredo, R. T., da Silva, L. C., Codentino, I. C., Fantini, M. C. A., Araújo, G. L. B., Araújo, A. A. S., Mesquita, M. E. (2016). Synthesis and application of the MCM-41 and SBA-15 as matrices for in vitro efavirenz release study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **31**: 153-159.
- Jia, X., Dong, S., Wang, E. (2016). Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **76**: 80-90.
- Jiang, J., Fan, W., Du, X. (2014). Nitrite electrochemical biosensing based on coupled graphene and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **51**: 343-348.
- Jiang, S., Penner, M. H. (2015). Selective oxidation of enzyme extracts for improved quantification of peroxidase activity. *Analytical Biochemistry* **476**: 20-25.

10. REFERENCIAS

- Jin, R., Ji, X., Yang, Y., Wang, H., Cao, A. (2013). Self-assembled graphene–dextran nanohybrid for killing drug-resistant cancer cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* **5**: 7181-7189.
- Ju, J., Chen, W. (2015). In situ growth of surfactant-free gold nanoparticles on nitrogen-doped graphene quantum dots for electrochemical detection of hydrogen peroxide in biological environments. *Analytical Chemistry* **87**: 1903-1910.
- Kale, P., Bodade, A., Chaudhari, G. N. (2017). Electrochemical peroxidase sensor based on magnesium oxide-chitosan nanobiocomposite film. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research* **6**: 9-17.
- Kamal, J. A., Behere, D. V. (2003). Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **94**: 236-242.
- Kang, Q., Yang, L., Cai, Q. (2008). An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt–Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. *Bioelectrochemistry* **74**: 62-65.
- Kang, Y., Yang, P., Markovic, N. M., Stamenkovic, V. R. (2016). Shaping electrocatalysis through tailored nanomaterials. *Nano Today* **11**: 587-600.
- Karimi-Maleh, H., Tahernejad-Javazmi, F., Ensafi, A. A., Moradi, R., Mallakpour, S., Beitollahi, H. (2014). A high sensitive biosensor based on FePt/CNTs nanocomposite/N-(4-hydroxyphenyl)-3, 5-dinitrobenzamide modified carbon paste electrode for simultaneous determination of glutathione and piroxicam. *Biosensors and Bioelectronics* **60**: 1-7.
- Karousis, N., Tagmatarchis, N., Tasis, D. (2010). Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **110**: 5366-5397.
- Keith, L. H.; Crummett, W.; Deegan, J.; Libby, R. A.; Taylor, J. K.; Wentler, G.; ACS Committee on Environmental Improvement Principles (1983) Principles of environmental analysis. *Analytical Chemistry* **55** (14): 2210–2218.
- Kim, Y. K., Kim, M. H., Min, D. H. (2011). Biocompatible reduced graphene oxide prepared by using dextran as a multifunctional reducing agent. *Chemical Communications* **47**: 3195-3197.

10. REFERENCIAS

- Koide, S. S. (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research* 18: 1091-1101.
- Krebs, E. G., Boyer, P. D. (1987) The Enzymes, Vol. 18. *Academic Press, New York*.
- Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley, R. E. (1985). C60: buckminsterfullerene. *Nature* 318: 162-163.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46: 1-27.
- Kumar, S., Ahlawat, W., Kumar, R., Dilbaghi, N. (2015). Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors and Bioelectronics* 70: 498-503.
- Kurbanoglu, S., Ozkan, S. A., & Merkoçi, A. (2017). Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 886-898.
- Lahann, J. (2008). Environmental nanotechnology: Nanomaterials clean up. *Nature Nanotechnology* 3: 320-321.
- Lai, J., Mu, X., Xu, Y., Wu, X., Wu, C., Li, C., Chen, J., Zhao, Y. (2010). Light-responsive nanogated ensemble based on polymer grafted mesoporous silica hybrid nanoparticles. *Chemical Communications* 46: 7370-7372.
- Lan, L., Yao, Y., Ping, J., Ying, Y. (2017). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors and Bioelectronics* 91: 504-514.
- Lattuada, M., Hatton, T. A. (2011). Synthesis, properties and applications of Janus nanoparticles. *Nano Today* 6: 286-308.
- Leceta, I., Guerrero, P., De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers* 93: 339-346.
- Li, D., Luo, L., Pang, Z., Ding, L., Wang, Q., Ke, H., Wei, Q. (2014). Novel phenolic biosensor based on a magnetic polydopamine-laccase-nickel nanoparticle loaded carbon nanofiber composite. *ACS Applied Materials & Interfaces* 6: 5144-5151.

10. REFERENCIAS

- Li, F., Feng, Y., Wang, Z., Yang, L., Zhuo, L., Tang, B. (2010a). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on the layered calcium carbonate–gold nanoparticles inorganic hybrid composite. *Biosensors and Bioelectronics* **25**: 2244-2248.
- Li, J., Yang, Z., Tang, Y., Zhang, Y., Hu, X. (2013). Carbon nanotubes-nanoflake-like SnS₂ nanocomposite for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics* **41**: 698-703.
- Li, Y., Schluesener, H. J., Xu, S. (2010b). Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* **43**: 29-41.
- Li, Y., Yan, K., Lee, H. W., Lu, Z., Liu, N., Cui, Y. (2016). Growth of conformal graphene cages on micrometre-sized silicon particles as stable battery anodes. *Nature Energy* **1**: 15029.
- Lian, H., Du, Y., Chen, X., Duan, L., Gao, G., Xiao, C., Zhuang, X. (2017). Core cross-linked poly (ethylene glycol)-graft-Dextran nanoparticles for reduction and pH dual responsive intracellular drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* **496**: 201-210.
- Liang, K., Fu, X., Wu, L., Qin, Y., Song, Y. (2016). A novel tyrosinase biosensor based on graphene and Co₃O₄ nanocomposite materials for rapid determining catechol. *International Journal of Electrochemical Science* **11**: 250-258.
- Lindgren, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Csöregi, E., Ardila, G. B., Sakharov, I. Y., Gazaryan, I. G. (2000). Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics* **15**: 491-497.
- Liu, H., Guo, K., Duan, C., Chen, X., Zhu, Z. (2016). A novel biosensor based on the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized in the three-dimensional flower-like Bi₂WO₆ microspheres. *Materials Science and Engineering: C* **64**: 243-248.
- Liu, J., Ong, W., Román, E., Lynn, M. J., Kaifer, A. E. (2000). Cyclodextrin-modified gold nanospheres. *Langmuir* **16**: 3000-3002.

10. REFERENCIAS

- Liu, S. Q., Kuroda-Sowa, T., Konaka, H., Suenaga, Y., Maekawa, M., Mizutani, T., Munakata, M. (2005). Silver (I) coordination polymers of fluorescent oligo (phenylenevinylene) with π - π stackings: luminescence and conductivity. *Inorganic Chemistry* **44**: 1031-1036.
- Liu, X., Yan, R., Zhu, J., Zhang, J., Liu, X. (2015). Growing TiO₂ nanotubes on graphene nanoplatelets and applying the nanonocomposite as scaffold of electrochemical tyrosinase biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **209**: 328-335.
- Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Dong, S. (2006). Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosensors and Bioelectronics* **21**: 2195-2201.
- Loh, K. P., Bao, Q., Ang, P. K., Yang, J. (2010). The chemistry of graphene. *Journal of Materials Chemistry* **20**: 2277-2289.
- Lu, J., Paliwala, T., Lim, S. C., Yu, C., Niu, T., Jacobson, A. J. (1997). Coordination polymers of Co(NCS)₂ with pyrazine and 4,4'-Bipyridine: syntheses and structures. *Inorganic Chemistry* **36**: 923-929.
- Lu, T. L., Tsai, Y. C. (2010). Electrocatalytic oxidation of acetylsalicylic acid at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **148**: 590-594.
- Lu, W., Luo, Y., Chang, G., Sun, X. (2011). Synthesis of functional SiO₂-coated graphene oxide nanosheets decorated with Ag nanoparticles for H₂O₂ and glucose detection. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 4791-4797.
- Lu, X., Wang, C., Wei, Y. (2009). One-dimensional composite nanomaterials: Synthesis by electrospinning and their applications. *Small* **5**: 2349-2370.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A. J., Smyth, M. R. (2006). Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* **18**: 319-326.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A. J., Smyth, M. R. (2006). Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* **18**: 319-326.

10. REFERENCIAS

- Luo, Y., Lu, W., Chang, G., Liao, F., Sun, X. (2011). One-step preparation of Ag nanoparticle–decorated coordination polymer nanobelts and their application for enzymeless H₂O₂ detection. *Electrochimica Acta* **56**: 8371-8374.
- Luong, J. H., Bouvrette, P., Male, K. B. (1997). Developments and applications of biosensors in food analysis. *Trends in Biotechnology* **15**: 369-377.
- Luong, J. H., Male, K. B., Glennon, J. D. (2008). Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology Advances* **26**: 492-500.
- Maji, S. K., Sreejith, S., Mandal, A. K., Ma, X., Zhao, Y. (2014). Immobilizing gold nanoparticles in mesoporous silica covered reduced graphene oxide: a hybrid material for cancer cell detection through hydrogen peroxide sensing. *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**: 13648-13656.
- Mandracchia, D., Trapani, A., Tripodo, G., Perrone, M. G., Giammona, G., Trapani, G., Colabufo, N. A. (2017). In vitro evaluation of glycol chitosan based formulations as oral delivery systems for efflux pump inhibition. *Carbohydrate Polymers* **166**: 73-82.
- Mani, V., Devadas, B., Chen, S. M. (2013). Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **41**: 309-315.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* **2**: 535-562.
- MarketsandMarkets (2017) Biosensors market by application (POC, home diagnostics, research labs, biodefense, environmental monitoring, food & beverages industry), technology, product (wearable and non-wearable), and geography - global forecast to 2022. *Report Code: SE 3097*.
- Masoomi, M. Y., Morsali, A. (2012). Applications of metal–organic coordination polymers as precursors for preparation of nano-materials. *Coordination Chemistry Reviews* **256**: 2921-2943.
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6**: 153-159.

10. REFERENCIAS

- Mei, L. P., Feng, J. J., Wu, L., Zhou, J. Y., Chen, J. R., Wang, A. J. (2015). Novel phenol biosensor based on laccase immobilized on reduced graphene oxide supported palladium–copper alloyed nanocages. *Biosensors and Bioelectronics* **74**: 347-352.
- Mermoux, M., Chabre, Y., Rousseau, A. (1991). FTIR and ¹³C NMR study of graphite oxide. *Carbon* **29**: 469-474.
- Moreno-Guzman, M., Martín, A., del Carmen Marín, M., Sierra, T., Ansón-Casaos, A., Martínez, M. T., Escarpa, A. (2016). Electrochemical behavior of hybrid carbon nanomaterials: the chemistry behind electrochemistry. *Electrochimica Acta* **214**: 286-294.
- Murugaiyan, S. B., Ramasamy, R., Gopal, N., Kuzhandaivelu, V. (2014). Biosensors in clinical chemistry: An overview. *Advanced Biomedical Research* **3**: 67.
- Nazari, M., Kashanian, S., Rafipour, R. (2015). Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as catechol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **145**: 130-138.
- Neely, W. B. (1961). Dextran: structure and synthesis. *Advances in Carbohydrate Chemistry* **15**: 341-369.
- Nelson, J. M., Dawson, C. R. (2006). Tyrosinase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **4**: 99-152.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **306**: 666-669.
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., O'Connor, B. F. (2017). Gel-filtration chromatography. *Protein Chromatography: Methods and Protocols* 15-25.
- Ohara, T. J. (1995). Osmium bipyridyl redox polymers used in enzyme electrodes. *Platinum Metals Review* **39**: 54-62.
- Ou, X., Tan, X., Liu, X., Lu, Q., Chen, S., Wei, S. (2015). A signal-on electrochemiluminescence biosensor for detecting Con A using phenoxy dextran-graphite-like carbon nitride as signal probe. *Biosensors and Bioelectronics* **70**: 89-97.

10. REFERENCIAS

- Pakapongpan, S., Poo-arporn, R. P. (2017). Self-assembly of glucose oxidase on reduced graphene oxide-magnetic nanoparticles nanocomposite-based direct electrochemistry for reagentless glucose biosensor. *Materials Science and Engineering: C* **76**: 398-405.
- Palchetti, I. (2016). New Trends in the Design of Enzyme-based Biosensors for Medical Applications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **16**: 1125-1133.
- Pang, Y., Zeng, G. M., Tang, L., Zhang, Y., Li, Z., Chen, L. J. (2011). Laccase biosensor using magnetic multiwalled carbon nanotubes and chitosan/silica hybrid membrane modified magnetic carbon paste electrode. *Journal of Central South University of Technology* **18**: 1849-1856.
- Park, S., An, J., Jung, I., Piner, R. D., An, S. J., Li, X., Velamakanni, A., Ruoff, R. S. (2009). Colloidal suspensions of highly reduced graphene oxide in a wide variety of organic solvents. *Nano Letters* **9**: 1593-1597.
- Park, W., Choi, K., Lafdi, K., Yu, C. (2012). Influence of nanomaterials in polymer composites on thermal conductivity. *Journal of Heat Transfer* **134**: 041302.
- Pendurthi, A. K., Karumanchi, S. (2017). Clinical study of diabetic patients with special reference to their glycemic status. *International Journal of Advances in Medicine* **3**: 166-170.
- Pérez, J. H., López-Ruiz, B., López-Cabarcos, E. (2016). Synthesis and characterization of microparticles based on poly-methacrylic acid with glucose oxidase for biosensor applications. *Talanta* **149**: 310-318.
- Perez, Y., Valdivia, A., Gomez, L., Simpson, B. K., Villalonga, R. (2005). Glycosidation of Cu, Zn-superoxide dismutase with end-group aminated dextran. Pharmacological and pharmacokinetics properties. *Macromolecular Bioscience* **5**: 1220-1225.
- Perro, A., Reculosa, S., Ravaine, S., Bourgeat-Lami, E., Duguet, E. (2005). Design and synthesis of Janus micro-and nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **15**: 3745-3760.
- Picola, I. P. D., Shi, Q., Fernandes, J. C., Petrônio, M. S., Lima, A. M. F., de Oliveira Tiera, V. A., Tiera, M. J. (2016). Chitosan derivatives for gene transfer: effect of

10. REFERENCIAS

- phosphorylcholine and diethylaminoethyl grafts on the in vitro transfection efficiency. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **27**: 1611-1630.
- Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P., González-Cortés, A. (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta* **53**: 5848-5866.
 - Pingarrón-Carrazón, J. M., Sánchez-Batanero, P. (1999) *Química Electroanalítica. Editorial Síntesis, Madrid.*
 - Pradhan, S., Xu, L., Chen, S. (2007). Janus nanoparticles by interfacial engineering. *Advanced Functional Materials* **17**: 2385-2392.
 - Pumera, M. (2011). Graphene in biosensing. *Materials Today* **14**: 308-315.
 - Pumera, M. (2014). Nanomaterials for electrochemical sensing and biosensing. *Pan Stanford Publishing, Singapore.*
 - Putzbach, W., Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors* **13**: 4811-4840.
 - Qu, J., Lou, T., Kang, S., Du, X. (2013a). Simultaneous determination of catechol and hydroquinone using a self-assembled laccase biosensor based on nanofilm. *Sensor Letters* **11**: 1567-1572.
 - Qu, J., Lou, T., Wang, Y., Dong, Y., Xing, H. (2015). Determination of catechol by a novel laccase biosensor based on zinc-oxide sol-Gel. *Analytical Letters* **48**: 1842-1853.
 - Qu, J., Lou, T., Wang, Y., Dong, Y., Xing, H. (2015). Determination of catechol by a novel laccase biosensor based on zinc oxide sol-gel. *Analytical Letters* **48**: 1842-1853.
 - Qu, J., Wang, Y., Guo, J., Lou, T., Dong, Y. (2014). Determination of catechol by a laccase biosensor based on silica-modified zirconia nanoparticles. *Analytical Letters* **47**: 2537-2547.
 - Qu, Y., Ma, M., Wang, Z., Zhan, G., Li, B., Wang, X., Fang, H., Zhang, H., Li, C. (2013b). Sensitive amperometric biosensor for phenolic compounds based on graphene–silk peptide/tyrosinase composite nanointerface. *Biosensors and Bioelectronics* **44**: 85-88.

10. REFERENCIAS

- Rai, G., Yadav, A. K., Jain, N. K., Agrawal, G. P. (2016). Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon. *Drug Delivery* **23**: 328-337.
- Ramsden, J. (2016). Nanotechnology: an introduction. *Elsevier, Amsterdam*.
- Raouf, J. B., Ojani, R., Karimi-Maleh, H., Hajmohamadi, M. R., Biparva, P. (2011). Multi-wall carbon nanotubes as a sensor and ferrocene dicarboxylic acid as a mediator for voltammetric determination of glutathione in hemolysed erythrocyte. *Analytical Methods* **3**: 2637-2643.
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., Duarte-Vázquez, M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews* **3**: 243-256.
- Ricketts, C. R. (1952). Dextran sulphate - a synthetic analogue of heparin. *Biochemical Journal* **51**: 129.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**: 603-632.
- Romero-Arcos, M., Garnica-Romo, M. G., Martinez-Flores, H. E., Vázquez-Marrufo, G., Ramírez-Bon, R., González-Hernández, J., Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Enzyme immobilization by amperometric biosensors with TiO₂. *Food Engineering Reviews* **8**: 235-250.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* **39**: 1747-1763.
- Saadaoui, M., Sánchez, A., Díez, P., Raouafi, N., Pingarrón, J. M., Villalonga, R. (2016). Amperometric xanthine biosensors using glassy carbon electrodes modified with electrografted porous silica nanomaterials loaded with xanthine oxidase. *Microchimica Acta* **183**: 2023-2030.
- Sadeghi, S., Fooladi, E., Malekaneh, M. (2015). A new amperometric biosensor based on Fe₃O₄/polyaniline/laccase/chitosan biocomposite-modified carbon paste electrode for determination of catechol in tea leaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **175**: 1603-1616.

10. REFERENCIAS

- Salvador, J., Marco, M. (2016). Amperometric biosensor for continuous monitoring Irgarol 1051 in sea water. *Electroanalysis* **28**: 1833-1838.
- Samphao, A., Butmee, P., Jitcharoen, J., Švorc, L., Raber, G., Kalcher, K. (2015). Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe₃O₄ nanoparticles. *Talanta* **142**: 35-42.
- Sánchez, C., Belleville, P., Popall, M., Nicole, L. (2011). Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chemical Society Reviews* **40**: 696-753.
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1247**: 1-11.
- Santhosh, C., Velmurugan, V., Jacob, G., Jeong, S. K., Grace, A. N., Bhatnagar, A. (2016). Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chemical Engineering Journal* **306**: 1116-1137.
- Satvekar, R. K., Rohiwal, S. S., Raut, A. V., Karande, V. A., Tiwale, B. M., Pawar, S. H. (2014). A silica-dextran nanocomposite as a novel matrix for immobilization of horseradish peroxidase, and its application to sensing hydrogen peroxide. *Microchimica Acta* **181**: 71-77.
- Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C. (2003). Layered double hydroxides: an attractive material for electrochemical biosensor design. *Analytical Chemistry* **75**: 3872-3879.
- Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y. (1966). Peroxidase isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties. *Journal of Biological Chemistry* **241**: 2166-2172.
- Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A., Lin, Y. (2010). Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis* **22**: 1027-1036.
- Shen, L., Yuan, C., Luo, H., Zhang, X., Chen, L., Li, H. (2011). Novel template-free solvothermal synthesis of mesoporous Li₄Ti₅O₁₂-C microspheres for high power lithium ion batteries. *Journal of Materials Chemistry* **21**: 14414-14416.

10. REFERENCIAS

- Shi, Y., Zhang, B. (2016). Recent advances in transition metal phosphide nanomaterials: synthesis and applications in hydrogen evolution reaction. *Chemical Society Review* **45**: 1529-1541.
- Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Hanaoka, T. A., Mizukami, F., Ono, M. (2011). Amperometric detection of phenolic compounds with enzyme immobilized in mesoporous silica prepared by electrophoretic deposition. *Sensors and Actuators B: Chemical* **153**: 361-368.
- Shukla, P., Pletschke, B. I. (2013) *Advances in Enzyme Biotechnology*. Springer International Publishing AG, New York.
- Siamaki, A. R., Abd El Rahman, S. K., Abdelsayed, V., El-Shall, M. S., Gupton, B. F. (2011). Microwave-assisted synthesis of palladium nanoparticles supported on graphene: A highly active and recyclable catalyst for carbon–carbon cross-coupling reactions. *Journal of Catalysis* **279**: 1-11.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 8735-8741.
- Song, W., Li, D. W., Li, Y. T., Li, Y., Long, Y. T. (2011). Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 3181-3186.
- Song, Y., Chen, S. (2014). Janus nanoparticles: preparation, characterization, and applications. *Chemistry - An Asian Journal* **9**: 418-430.
- Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D., Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics* **76**: 195-212.
- Spokoyny, A. M., Kim, D., Sumrein, A., Mirkin, C. A. (2009). Infinite coordination polymer nano-and microparticle structures. *Chemical Society Reviews* **38**: 1218-1227.
- Stasyuk, N., Gayda, G., Klepach, H., Gonchar, M. (2016). Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensors on hydrogen peroxide. *Sensor Letters* **14**: 1169-1177.

10. REFERENCIAS

- Subrahmanyam, K. S., Manna, A. K., Pati, S. K., Rao, C. N. R. (2010). A study of graphene decorated with metal nanoparticles. *Chemical Physics Letters* **497**: 70-75.
- Suginta, W., Khunkaewla, P., Schulte, A. (2013). Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. *Chemical Reviews* **113**: 5458-5479.
- Swoboda, B. E., Massey, V. (1965). Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry* **240**: 2209-2215.
- Tam, S. C., Blumenstein, J., Wong, J. T. (1976). Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**: 2128-2131.
- Tang, L., Zhou, Y., Zeng, G., Li, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Chen, G., Yang, G., Lei, X., Wu, M. (2013). A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon–Au/L-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Analyst* **138**: 3552-3560.
- Tang, Z., Fu, Y., Ma, Z. (2017). Bovine serum albumin as an effective sensitivity enhancer for peptide-based amperometric biosensor for ultrasensitive detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics* **94**: 394-399.
- Tang, Z., Kotov, N. A. (2005). One-dimensional assemblies of nanoparticles: preparation, properties, and promise. *Advanced Materials* **17**: 951-962.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 121-131.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Tian, J., Liu, S., Sun, X. (2010). Supramolecular microfibrils of o-phenylenediamine dimers: oxidation-induced morphology change and the spontaneous formation of Ag nanoparticle decorated nanofibers. *Langmuir* **26**: 15112-15116.
- Tong, M. L., Wu, Y. M., Ru, J., Chen, X. M., Chang, H. C., Kitagawa, S. (2002). Pseudo-polyrotaxane and β -sheet layer-based three-dimensional coordination polymers

10. REFERENCIAS

- constructed with silver salts and flexible pyridyl-type ligands. *Inorganic Chemistry* **41**: 4846-4848.
- Turner, A. P. (1994). Biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 49-53.
 - Unnikrishnan, B., Palanisamy, S., Chen, S. M. (2013). A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite. *Biosensors and Bioelectronics* **39**: 70-75.
 - Uppal, M. A., Kafizas, A., Ewing, M. B., Parkin, I. P. (2013). The room temperature formation of gold nanoparticles from the reaction of cyclohexanone and auric acid; a transition from dendritic particles to compact shapes and nanoplates. *Journal of Materials Chemistry A* **1**: 7351-7359.
 - Valdivia, A., Villalonga, R., Di Pierro, P., Pérez, Y., Mariniello, L., Gómez, L., Porta, R. (2006). Transglutaminase-catalyzed site-specific glycosidation of catalase with aminated dextran. *Journal of Biotechnology* **122**: 326-333.
 - Vásquez, G., Rey, A., Rivera, C., Iregui, C., Orozco, J. (2017). Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. *Biosensors and Bioelectronics* **87**: 453-458.
 - Verma, N., Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides - a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **175**: 3093-3119.
 - Vicentini, F. C., Garcia, L. L., Figueiredo-Filho, L. C., Janegitz, B. C., Fatibello-Filho, O. (2016). A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology* **84**: 17-23.
 - Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., Prakash, H. (2016). Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **4**: 11.
 - Villalonga, R., Díez, P., Casado, S., Eguílaz, M., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2012). Electropolymerized network of polyamidoamine dendron-coated gold nanoparticles as novel nanostructured electrode surface for biosensor construction. *Analyst* **137**: 342-348.

10. REFERENCIAS

- Villalonga, R., Díez, P., Sánchez, A., Aznar, E., Martínez-Máñez, R., Pingarrón, J. M. (2013). Enzyme-controlled sensing–actuating nanomachine based on Janus Au–mesoporous silica nanoparticles. *Chemistry–A European Journal* **19**: 7889-7894.
- Villalonga, R., Díez, P., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2011). Wiring horseradish peroxidase on gold nanoparticles-based nanostructured polymeric network for the construction of mediatorless hydrogen peroxide biosensor. *Electrochimica Acta* **56**: 4672-4677.
- Villalonga, R., Tachibana, S., Pérez, Y., Asano, Y. (2005). Increased conformational and thermal stability properties for phenylalanine dehydrogenase by chemical glycosidation with end-group activated dextran. *Biotechnology Letters* **27**: 1311-1317.
- Walther, A., Müller, A. H. (2013). Janus particles: synthesis, self-assembly, physical properties, and applications. *Chemical Reviews* **113**: 5194-5261.
- Wang, F., Gong, W., Wang, L., Chen, Z. (2015). Enhanced amperometric response of a glucose oxidase and horseradish peroxidase based bienzyme glucose biosensor modified with a film of polymerized toluidine blue containing reduced graphene oxide. *Microchimica Acta* **182**: 1949-1956.
- Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst* **130**: 421-426.
- Wang, J., Wang, L., Di, J., Tu, Y. (2009). Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. *Talanta* **77**: 1454-1459.
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., Lin, Y. (2011a). Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* **29**: 205-212.
- Wang, Y., Wang, Z., Rui, Y., Li, M. (2015). Horseradish peroxidase immobilization on carbon nanodots/CoFe layered double hydroxides: direct electrochemistry and hydrogen peroxide sensing. *Biosensors and Bioelectronics* **64**: 57-62.
- Wang, Y., Zhang, S., Du, D., Shao, Y., Li, Z., Wang, J., Engelhard, M. H., Li, J., Lin, Y. (2011b). Self assembly of acetylcholinesterase on a gold nanoparticles–graphene

10. REFERENCIAS

- nanosheet hybrid for organophosphate pesticide detection using polyelectrolyte as a linker. *Journal of Materials Chemistry* 21: 5319-5325.
- Warner, J., Andreescu, S. (2016). An acetylcholinesterase (AChE) biosensor with enhanced solvent resistance based on chitosan for the detection of pesticides. *Talanta* **146**: 279-284.
 - Weltin, A., Kieninger, J., Urban, G. A. (2016). Microfabricated, amperometric, enzyme-based biosensors for *in vivo* applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**: 4503-4521.
 - Westmeier, D., Stauber, R. H., Docter, D. (2016). The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicology and Applied Pharmacology* **299**: 53-57.
 - Wilson, R., Turner, A. P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics* **7**: 165-185.
 - Wu, D., Du, D., Lin, Y. (2016). Recent progress on nanomaterial-based biosensors for veterinary drug residues in animal-derived food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **83**: 95-101.
 - Xiang, C., Zou, Y., Sun, L. X., Xu, F. (2009). Direct electrochemistry and enhanced electrocatalysis of horseradish peroxidase based on flowerlike ZnO–gold nanoparticle–Nafion nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical* **136**: 158-162.
 - Xin, Y., Fu-bing, X., Hong-wei, L., Feng, W., Di-zhao, C., Zhao-yang, W. (2013). A novel H₂O₂ biosensor based on Fe₃O₄–Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets–Nafion film modified screen-printed carbon electrode. *Electrochimica Acta* **109**: 750-755.
 - Xu, J., Su, Z., Chen, M. S., Chen, S. S., Sun, W. Y. (2009). New metal complexes with 5-(1H-imidazol-4-ylmethyl) aminoisophthalic acid: Syntheses, structures, electrochemistry and electrocatalysis. *Inorganica Chimica Acta* **362**: 4002-4008.

10. REFERENCIAS

- Xu, S., Qi, H., Zhou, S., Zhang, X., Zhang, C. (2014). Mediatorless amperometric bienzyme glucose biosensor based on horseradish peroxidase and glucose oxidase cross-linked to multiwall carbon nanotubes. *Microchimica Acta* **181**: 535-541.
- Xue, Y. S., Jin, F. Y., Zhou, L., Liu, M. P., Xu, Y., Du, H. B., You, X. Z. (2012). Structural diversity and properties of coordination polymers built from a rigid octadentate carboxylic acid. *Crystal Growth & Design* **12**: 6158-6164.
- Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z., Zhao, Y. (2011). Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale* **3**: 362-382.
- Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2005). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**: 884-886.
- Yáñez-Sedeño, P., Villalonga, R., Pingarrón, J. M. (2015). Electroanalytical methods based on hybrid nanomaterials. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1-18.
- Yang, W., Ratinac, K. R., Ringer, S. P., Thordarson, P., Gooding, J. J., Braet, F. (2010). Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene? *Angewandte Chemie International Edition* **49**: 2114-2138.
- Yang, Y., Asiri, A. M., Du, D., Lin, Y. (2014). Acetylcholinesterase biosensor based on a gold nanoparticle–polypyrrole–reduced graphene oxide nanocomposite modified electrode for the amperometric detection of organophosphorus pesticides. *Analyst* **139**: 3055-3060.
- Yeh, Y. C., Creran, B., Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* **4**: 1871-1880.
- Yin, H., Ai, S., Shi, W., Zhu, L. (2009). A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on gold nanoparticles–silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horseradish peroxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical* **137**: 747-753.
- Yin, H., Zhang, Q., Zhou, Y., Ma, Q., Zhu, L., Ai, S. (2011). Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film

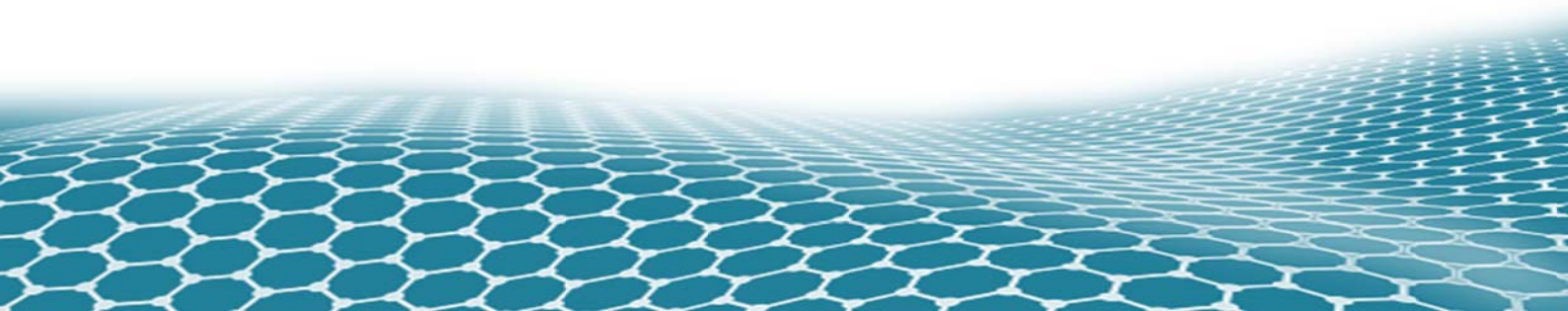
10. REFERENCIAS

- modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples. *Electrochimica Acta* **56**: 2748-2753.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* **13**: 1133-1174.
 - Yu, D., Dai, L. (2009). Self-assembled graphene/carbon nanotube hybrid films for supercapacitors. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **1**: 467-470.
 - Yu, Y., Chen, Z., He, S., Zhang, B., Li, X., Yao, M. (2014). Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **52**: 147-152.
 - Zeng, Q., Cheng, J. S., Liu, X. F., Bai, H. T., Jiang, J. H. (2011). Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 3456-3463.
 - Zhang, H., Lu, Q., Zuo, F., Yuan, R., Chen, S. (2017). A sandwich electrochemiluminescent biosensor based on enzymatic reaction to in situ generate coreactant of conjugated polymer for Con A detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **241**: 887-894.
 - Zhang, S., Yang, K., Feng, L., Liu, Z. (2011). In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized graphene. *Carbon* **49**: 4040-4049.
 - Zhao, H., Ji, X., Wang, B., Wang, N., Li, X., Ni, R., Ren, J. (2015). An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- β -cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. *Biosensors and Bioelectronics* **65**: 23-30.
 - Zhao, Y., Li, K., Li, J. (2010). Solvothermal synthesis of multifunctional coordination polymers. *Zeitschrift für Naturforschung B* **65**: 976-998.
 - Zhiguo, G., Shuping, Y., Zaijun, L., Xiulan, S., Guangli, W., Yinjun, F., Junkang, L. (2011). An ultrasensitive hydrogen peroxide biosensor based on electrocatalytic synergy of graphene-gold nanocomposite, CdTe-CdS core-shell quantum dots and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* **701**: 75-80.

10. REFERENCIAS

- Zhou, J., Li, H., Yang, H., Cheng, H., Lai, G. (2017). Immobilization of glucose oxidase on a carbon nanotubes/dendrimer-ferrocene modified electrode for reagentless glucose biosensing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **17**: 212-216.
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X., Luo, J., Li, C., Luan, S. (2010). A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites. *Electrochimica Acta* **55**: 3055-3060.
- Zhou, Y., Tang, L., Zeng, G., Chen, J., Cai, Y., Zhang, Y., Yang, G., Liu, Y., Zhang, C., Tang, W. (2014). Mesoporous carbon nitride based biosensor for highly sensitive and selective analysis of phenol and catechol in compost bioremediation. *Biosensors and Bioelectronics* **61**: 519-525.
- Zhou, Y., Yin, H., Meng, X., Xu, Z., Fu, Y., Ai, S. (2012). Direct electrochemistry of sarcosine oxidase on graphene, chitosan and silver nanoparticles modified glassy carbon electrode and its biosensing for hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta* **71**: 294-301.
- Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., Lin, Y. (2014). Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical Chemistry* **87**: 230-249.

**ANEXO:
PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS**





Cite this: *Analyst*, 2016, **141**, 4162

Novel reduced graphene oxide–glycol chitosan nanohybrid for the assembly of an amperometric enzyme biosensor for phenols†

Abderrahmane Boujakhrou, ^a Sandra Jimenez-Falcao, ^a Paloma Martínez-Ruiz, ^b Alfredo Sánchez, ^a Paula Díez, ^a José M. Pingarrón*^{a,c} and Reynaldo Villalonga*^{a,c}

A novel water-soluble graphene derivative was prepared from graphene oxide *via* a two-step modification approach. Graphene oxide was first functionalised with reactive epoxy groups by covalent modification with (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane and further cross-linked with glycol chitosan. This graphene derivative was characterized using different microscopy and physicochemical methods and employed as a coating material for a glassy carbon electrode. The nanostructured surface was used as a support for the covalent immobilization of the enzyme laccase through cross-linking with glutaraldehyde. The enzyme electrode was tested for the amperometric detection of different phenolic compounds, which displayed excellent analytical behaviour toward catechol with a linear range of response from 200 nM to 15 μ M, sensitivity of 93 mA M⁻¹ cm⁻², and low detection limit of 76 nM. The enzyme biosensor showed high stability when stored at 4 °C under dry conditions and was successfully employed to quantify the total phenolic compounds in commercial herbal tea samples.

Received 24th December 2015,

Accepted 29th April 2016

DOI: 10.1039/c5an02640g

www.rsc.org/analyst

Introduction

The design of reliable, highly sensitive, reproducible and selective electrochemical biosensors implies the preparation of advanced 3D transducer elements with specific chemical functionalities that allow high loadings and the stable immobilization of bioreceptors. These transducer interfaces should also provide proper hydrophilic microenvironments for the successful occurrence of the biorecognition process.^{1–3} In addition, they should have high electroconductive properties to ensure fast electron transfer at the sensing surface.^{4,5}

During the last decade, nanomaterials engineering has provided a great variety of advanced electroconductive materials with well-defined morphology, size and composition, which can be used as building blocks for the assembly of novel 3D transducer elements.^{4–8} In this context, special interest has been devoted to prepare new graphene-based nanomaterials for electrochemical biosensing^{9–12} due to their relative low

cost, large surface-to-volume ratio and remarkable electrical, mechanical and thermal properties and biocompatibility.¹³

However, graphene nanosheets are highly hydrophobic materials consisting entirely of sp₂-hybridized carbon atoms without any other chemical functional groups.¹⁴ This structural characteristic causes very low solubility in water and does not allow stable and large immobilization of bioreceptors through covalent linkages.¹⁵ Hence, the development of new graphene-based composites and hybrid nanomaterials with tailored characteristics is a challenge for biosensor technology.

Recently, we proposed the covalent modification of silanized reduced graphene oxide derivatives with water-soluble polymers as a rational approach to prepare highly conductive nanomaterials enriched with hydrophilic chemical groups.^{10,16–18} This synthetic strategy ensures the preparation of highly functionalized graphene derivatives with low modification of its basal structure, thus preserving its π -conjugated carbon-based structure.

It should be highlighted that chitosan, a linear amino polysaccharide of glucosamine and *N*-acetylglucosamine units obtained by alkaline deacetylation of chitin, has been largely employed to prepare graphene derivatives for biosensing purposes.^{19–21} This fact has been supported by the unique polycationic and biocompatibility properties of this polymer.¹⁹ However, the low solubility of chitosan in neutral and alkaline media limits the preparation of full water-soluble graphene-based nanocomposite and nanohybrids.

^aDepartment of Analytical Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315

^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain

^cIMDEA Nanoscience, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available: Optimization of biosensor construction and stability studies. See DOI: 10.1039/c5an02640g

SUPPORTING INFORMATION

Novel reduced graphene oxide-glycol chitosan nano hybrid for the assembly of amperometric enzyme biosensor for phenols

Abderrahmane Boujakhrou,^a Sandra Jimenez-Falcao,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Alfredo Sánchez,^a Paula Díez,^a José M. Pingarrón,^{*a,c} Reynaldo Villalonga^{*a,c}

^aDepartment of Analytical Chemistry and ^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid Spain.

^cIMDEA Nanoscience, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain.

*Corresponding authors: Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315; E-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es

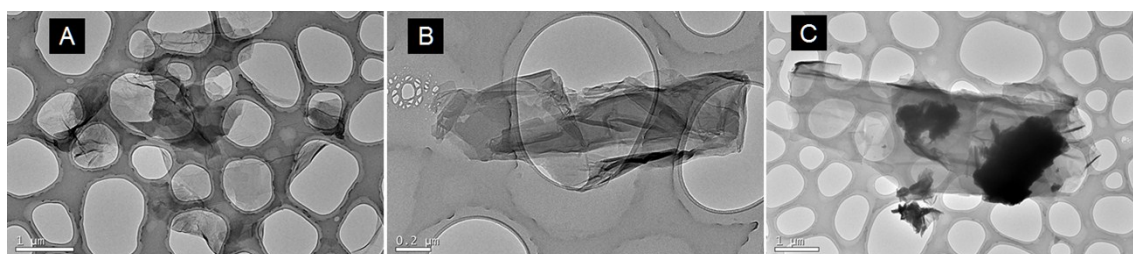


Figure 1S. TEM images of GO (A), Sil-GO (B) and GC-rGO (C).

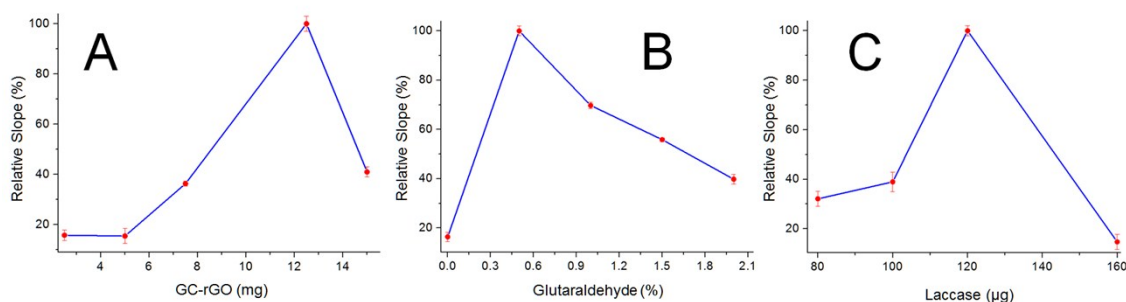


Figure 2S. Influence of the amount of GC-rGO (A), glutaraldehyde (B) and laccase (C) on the amperometric signal of the enzyme electrode toward catechol in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 5.5. Working potential = -150 mV.

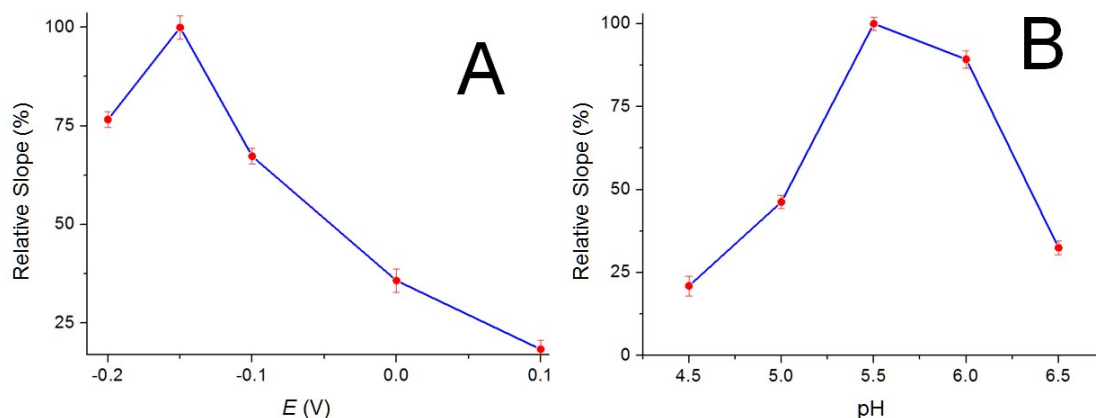


Figure 3S. Influence of the working potential (A) and pH (B) on the amperometric signal of the enzyme electrode toward catechol.

Table 1S. Comparison of the analytical performance of relevant laccase-based enzyme biosensors for catechol.

Electrode	Linear Range (μM)	Sensitivity (mA/M)	Limit of Detection (nM)	K_M (μM)
Lac/Au ¹	1 – 400	15	1000	5400
Lac/MCNT-CS/GCE ²	1.2 – 30	–	660	9.43
Lac/N-OMC/PVA/Au ³	0.39 – 8.98	290	310	6.28
Lac/CS/SiO ₂ -ZrO ₂ /GCE ⁴	1 – 100	8.8	350	–
Lac/PANI/GCE ⁵	3.2 – 19.6	706.7	2070	–
Lac/rGO-PdCuNC/GCE ⁶	1655 – 5155	5.51	1500	–
Lac/Fe ₃ O ₄ -PANI/CS/CPE ⁷	0.5 – 80	–	400	1.09
Lac/Cys/Au ⁸	10 – 100	–	4760	–
Lac/MCNT/GCE ⁹	20 – 1000	-	2000	-
Lac/CS/ZnO/GCE ¹⁰	1 – 100	10.52	290	-
Lac/Nafion/Au-CZF/GCE ¹¹	0.17 – 7	1626	166	-
Lac/GC-rGO/GCE*	0.2 – 15	6.5	76	93.4

Lac: laccase; **MCNT:** multiwalled carbon nanotubes; **CS:** chitosan; **GCE:** glassy carbon electrode; **N-OMC:** nitrogen-doped ordered mesoporous carbon; **PVA:** polyvinyl alcohol; **SiO₂-ZrO₂:** silica-modified zirconia nanoparticles; **rGO:** reduced graphene oxide; **PdCuNC:** palladium-copper alloyed nanocages; **Fe₃O₄:** Fe₃O₄ magnetic nanoparticles; **PANI:** polyaniline; **CPE:** carbon paste electrode; **Cys:** cysteamine; **ZnO:** zinc oxide nanoparticles; **Au-CZF:** zein ultrafine fibers containing gold nanoparticles. * This work.

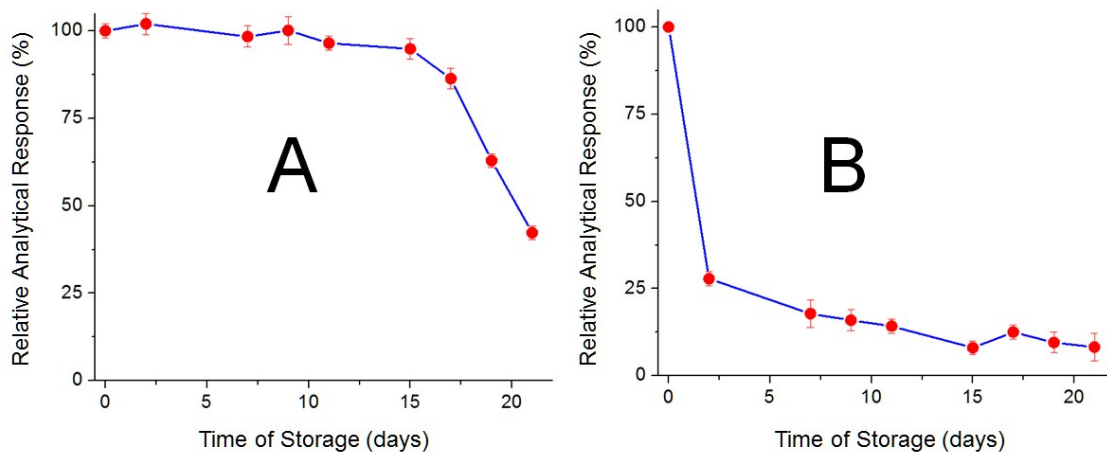


Figure 4S. Effect of time of storage at 4°C under wet (A) and dry (B) conditions on the amperometric response of the enzyme biosensor.

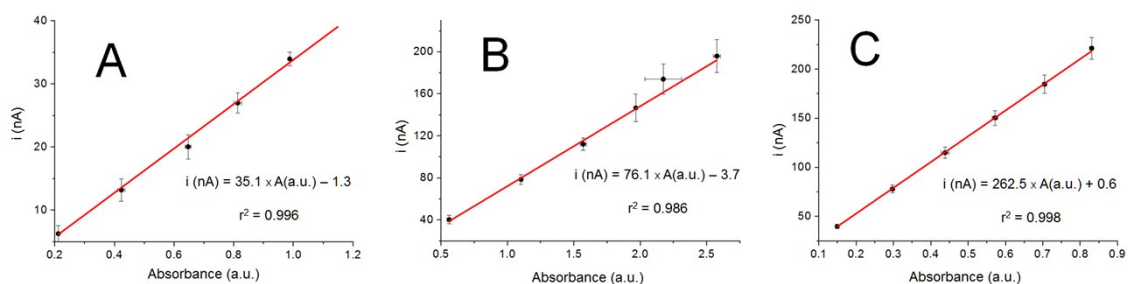


Figure 5S. Relationship between the analytical signal of the biosensor and the absorbance at 750 nm of catechol samples analyzed by the Folin-Ciocalteu colorimetric method. A) Red fruit tea, B) Green-lemon tea, and C) Peppermint tea.

References

1. G. Gupta, V. Rajendran and P. Atanassov, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1577.
2. Y. Liu, X. Qu, H. Guo, H. Chen, B. Liu and S. Dong, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 2195.
3. M. Guo, H. Wang, D. Huang, Z. Han, Q. Li, X. Wang and J. Chen, *Sci. Technol. Adv. Mat.*, 2014, **15**, 035005.
4. J. Qu, Y. Wang, J. Guo, T. Lou and Y. Dong, *Anal. Lett.*, 2014, **47**, 2537-2547.
5. M. Nazari, S. Kashanian and R. Rafipour, *Spectrochim. Acta A*, 2015, **145**, 130.
6. L.P. Mei, J.J. Feng, L. Wu, J.Y. Zhou, J.R. Chen and A.J. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **74**, 347.
7. S. Sadeghi, E. Fooladi and M. Malekaneh, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **175**, 1603.

8. E. Akyilmaz, B. Şahin and H. Türkmen, *Sensor Lett.*, 2014, **12**, 1519.
9. J. Qu, T. Lou, S. Kang and X. Du, *Sensor Lett.*, 2013, **11**, 1567.
10. J. Qu, T. Lou, Y. Wang, Y. Dong and H. Xing, *Anal. Lett.*, 2015, **48**, 1842.
11. X. Chen, D. Li, G. Li, L. Luo, N. Ullah, Q. Wei and F. Huang, *Appl. Surf. Sci.*, 2015, **328**, 444.



Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 3518

Decorating graphene oxide/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors†

Abderrahmane Boujakhrou, ^a Alfredo Sánchez, ^a Paula Díez, ^a Sandra Jiménez-Falcao, ^a Paloma Martínez-Ruiz, ^b Miriam Peña-Álvarez, ^c José M. Pingarrón*^{ad} and Reynaldo Villalonga*^{ad}

A novel strategy was employed to prepare a water-soluble graphene derivative by using dextran-based polymer brushes as solubilizing agents. Graphene oxide was grafted with (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane and further decorated with Au nanoparticles. This hybrid nanomaterial was then reduced and anchored with polysaccharide-based polymer brushes by chemisorption of an end-group thiolated dextran derivative on the Au nanoparticles. The resulting hybrid nonmaterial allowed highly stable aqueous dispersions to be obtained, which were used to coat glassy carbon electrodes for the preparation of a model tyrosinase electrochemical biosensor for catechol. The enzyme electrode showed excellent electroanalytical performance with fast response in about 5 s, a linear range of 100 pM–120 nM, a very high sensitivity of 45.9 A M⁻¹ and a very low detection limit of 40 pM for catechol.

Received 11th March 2015,
Accepted 18th March 2015

DOI: 10.1039/c5tb00451a

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

The design of novel hybrid nanomaterials with well-defined and desired properties is a cornerstone for the development of advanced and miniaturized electronic devices, drug carrier systems and fuel and solar cells.¹ These advanced nanomaterials can also be employed as building blocks for the assembly of nanostructured surfaces for the construction of reliable and robust electrochemical biosensors.² For such analytical application, highly electroconductive nanomaterials with improved capability for the stable immobilization of biological receptors are mainly desired.

Since its discovery, graphene has emerged as a usefulness nanomaterial for electroanalysis,³ due to the unique electroconductive properties, relative low cost, large surface-to-volume ratio, flexibility, remarkable mechanical and thermal stability and biocompatibility of this nanomaterial.⁴ However, graphene

is a highly hydrophobic nanomaterial showing very low solubility in water and many organic solvents, and tending to form irreversible agglomerates through strong π - π stacking and van der Waals interactions.⁵ In addition, the absence of chemical functional groups in graphene limits the stable and large immobilization of biomolecules through covalent linkages.^{2a} For these reasons, the design of new graphene hybrid derivatives for biosensor technology has received considerable attention.

Graphene nanohybrids have been mainly prepared by chemical derivatization of either the raw nanomaterial or graphene oxide (GO),⁶ a water soluble derivative that can be easily prepared by oxidative treatment of graphite.⁷ However, these methods often yield nanomaterials with poor electroconductive characteristics due to the large destruction of the hyperconjugated π system in graphene, which reduces the electron mobility in the nanosized material. Recently we proposed the group-selective silanization of the hydroxyl groups on the basal planes of GO for further anchoring of polymeric materials as a useful approach to prepare soluble and highly functionalized graphene derivatives with low modification of its basal structure.⁸

A great variety of polymer-graphene nanohybrids have been described in the literature.⁹ In general, these materials showed high coverage of the carbon sheets with the macromolecules yielding derivatives with improved solubility and biocompatibility. However, such high surface coverage can limit the application of these nanohybrids in biosensor technology due to reduction of the electron and mass transfer processes at the electrode

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315

^b Department of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain

^c Department of Physical Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain

^d IMDEA Nanoscience, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Characterization of the hybrid nanomaterial and the enzyme biosensor. See DOI: 10.1039/c5tb00451a

SUPPORTING INFORMATION

Decorating graphene/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors

Abderrahmane Boujakhrou,^a Alfredo Sánchez,^a Paula Díez,^a Sandra Jimenez,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Miriam Peña-Álvarez,^c José M. Pingarrón,^{*a,d} Reynaldo Villalonga^{*a,d}

^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Organic Chemistry I & ^cDepartment of Physical Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid Spain.

Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315; E-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es

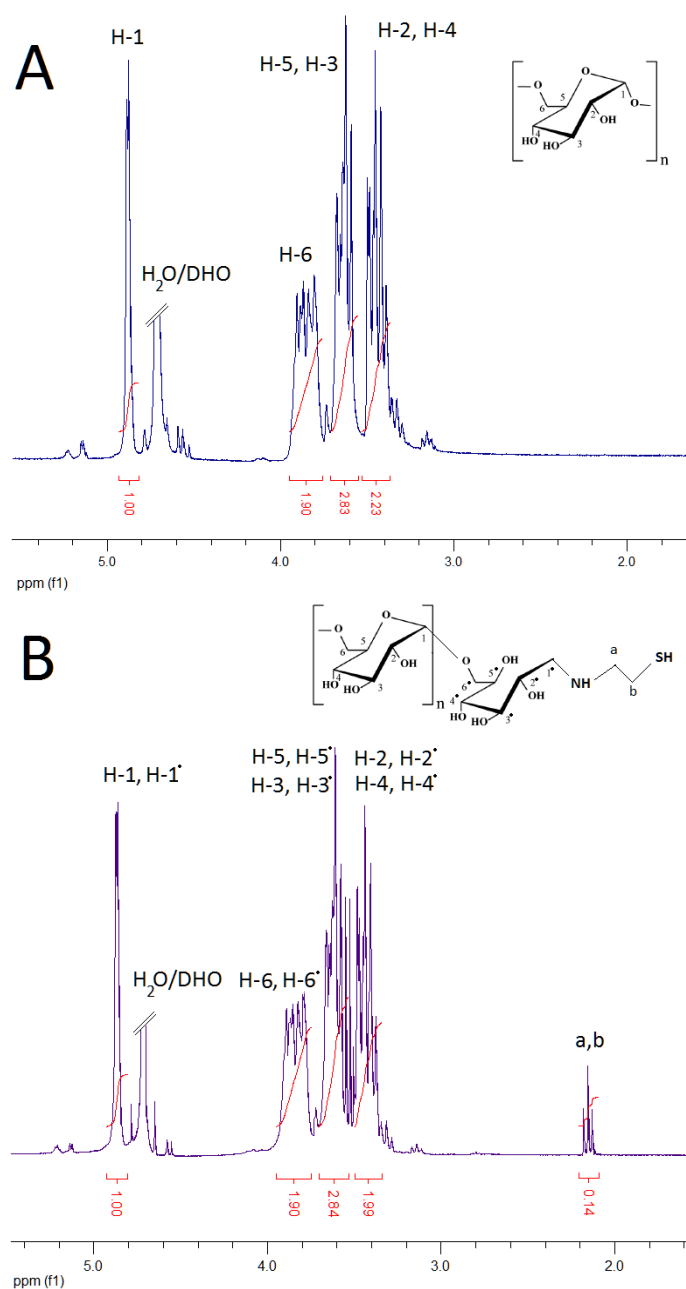


Figure 1S. ¹H-RMN spectra of dextran (A) and dextran-cysteamine (B).

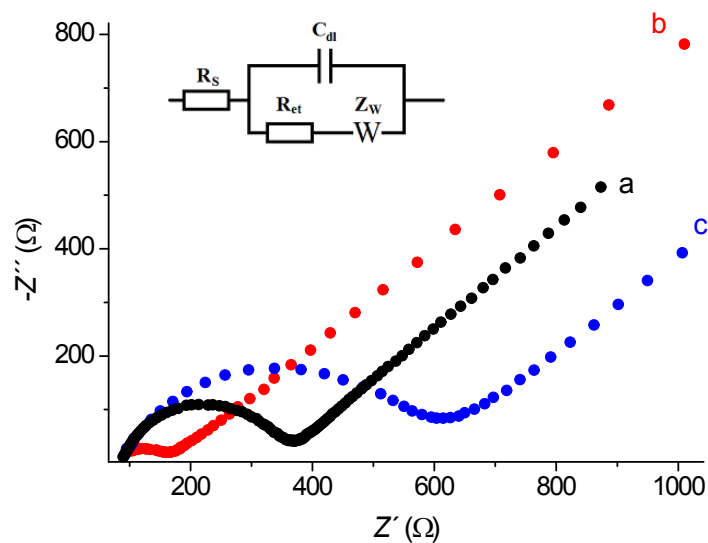


Figure 2S. Electrochemical impedance spectra obtained at a glassy carbon electrode before (a) and after coating with Dex-Au-Sil-rGO (b) and further immobilization of tyrosinase (c), in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1).

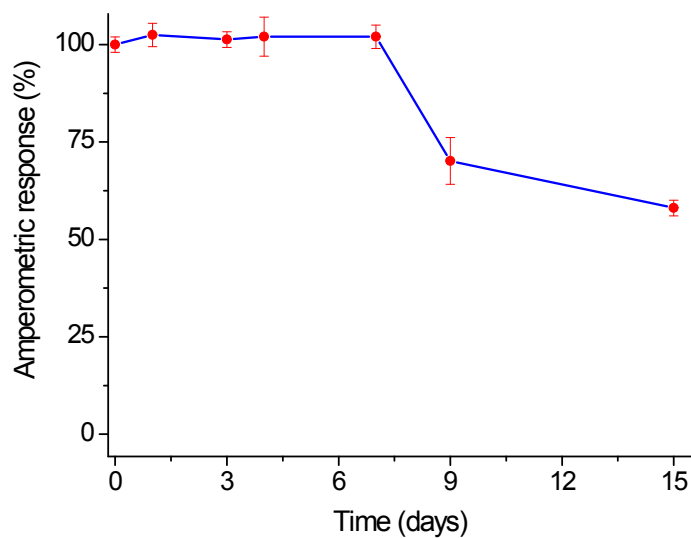


Figure 3S. Effect of time of storage at 4°C on the amperometric response of the biosensor.

Table 1S. Analytical properties of graphene-based tyrosinase biosensors for catechol.

Electrode	Linear Range (M)	Limit of Detection (M)	Sensitivity (mA·M⁻¹ / A·M⁻¹·cm⁻²)
Tyr-Au/PBA-GO/SPE¹	8.3x10 ⁻⁸ – 2.3x10 ⁻⁵	2.4x10 ⁻⁸	160 / 5.16
Tyr-GR-SP/ GCE²	1x10 ⁻⁹ – 1.7x10 ⁻⁵	2.3x10 ⁻¹⁰	-
Tyr/TNT/GNPs/GCE³	3x10 ⁻⁷ – 1.1x10 ⁻⁴	5.5x10 ⁻⁸	150 / 2.14
Tyr/GR-chitosan/GCE⁴	1x10 ⁻⁶ – 4x10 ⁻⁴	7.5x10 ⁻⁷	69 / 0.99
Tyr/PAMAM- rGO/GCE⁵	1x10 ⁻⁸ – 2.2x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁹	424 / 6.06
Tyr/rGO/SPE⁶	2x10 ⁻⁶ –1.6x10 ⁻⁵	1x10 ⁻¹¹	89.8 / -
Tyr/CMC-rGO/GCE⁷	2x10 ⁻⁶ –5.6x10 ⁻⁵	2x10 ⁻¹⁰	270 / 3.86
Tyr/Dex-Au-Sil-rGO/GCE (this work)	1x10 ⁻¹⁰ – 1.2x10 ⁻⁷	4x10 ⁻¹¹	45900 / 656

Tyr: tyrosinase; Au: Au nanoparticles; PBA: 1-pyrenebutanoic acid; GO: graphene oxide; SPE: screen-printed electrode; GR: graphene; SP: silk peptide; TNT: TiO₂ nanotubes; GNPs: graphene nanoplatelets; GCE: glassy carbon electrode; PAMAM: PAMAM G-4 dendrimer; rGO: reduced graphene oxide; CMC: carboxymethyl cellulose; Dex: dextran; Sil: 3-mercaptopropyl trimethoxysilane.

References

- 1 W. Song, D.W. Li, Y.T. Li, Y. Li, Y.T. Long, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 3181.
- 2 Y. Qu, M. Ma, Z. Wang, G. Zhan, B. Li, X. Wang, H. Fang, H. Zhang, C. Li, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **44**, 85.
- 3 X. Liu, R. Yan, J. Zhu, J. Zhang, X. Liu, *Sensor. Actuat. B Chem.*, 2015, 209, 328.
- 4 H. Yin, Q. Zhang, Y. Zhou, Q. Ma, T. Liu, L. Zhu, S. Ai, *Electrochim. Acta*, 2011, 56, 2748.
- 5 E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martinez-Ruiz, J. Reviejo, J. M. Pingarron, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2289.
- 6 L. Baptista-Pires, B. Pérez-López, C. C. Mayorga-Martinez, E. Morales-Narváez, N. Domingo, M. J. Esplandiu, F. Alzina, C. M. Sotomayor-Torres, A. Merkoçi; *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **61**, 655.
- 7 E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martinez-Ruiz, A. Sanchez, V. Garcia-Baonza, J. M. Pingarron, *ChemPlusChem*, 2014, **79**, 1334.

Single-Walled Carbon Nanotubes/Au–Mesoporous Silica Janus Nanoparticles as Building Blocks for the Preparation of a Bienzyme Biosensor

Abderrahmane Boujakhrou,^[a] Enrique Sánchez,^[a] Paula Díez,^[a] Alfredo Sánchez,^[a] Paloma Martínez-Ruiz,^[b] Concepción Parrado,^[a] José M. Pingarrón,^{*,[a]} and Reynaldo Villalonga^{*,[a]}

Gold–mesoporous silica Janus nanoparticles were prepared through a masking strategy and further employed as building blocks for the preparation of bienzyme biosensors through toposelective immobilization of the corresponding enzymes. The system was evaluated by immobilizing glucose oxidase and horseradish peroxidase on the Au and mesoporous silica faces, respectively. The anisotropic nanoparticles were deposited on glassy carbon electrodes coated with single-walled

carbon nanotubes in order to construct an amperometric biosensor for glucose detection. The enzymatic electrode showed excellent electroanalytical performance with a fast response in about 6 s, a linear range of 490 nM–600 μM, a high sensitivity of 4.3 mA M⁻¹, and a low detection limit of 360 nM for glucose. This biosensor was successfully employed to determine the content of this monosaccharide in commercial soft drink samples.

1. Introduction

The development of reliable, sensitive, and specific methods for food and drink analysis is a major concern in the food industry.^[1] In general, current methods for the analysis of food and drink are mainly based on chromatographic and spectrophotometric techniques. However, these procedures often require time-consuming sample treatment protocols and relatively large equipment that is not suitable for the in situ measurement of different food components and contaminants.^[2]

Biosensor technology offers a suitable alternative to conventional methods for food analysis, allowing rapid, direct, in situ, and specific detection of nutrients, additives, pathogens, and potential food contaminants.^[3] Progress in microelectronic and communication technology allows the development of portable and miniaturized electrochemical biosensor devices that are able to connect with cell phones for data acquisition, communication, and sharing. However, major advances in electroanalytical biosensors have been associated with the use of nanomaterials as building blocks to design sensing interfaces with improved characteristics.^[4]

Nano-sized materials have been widely employed as transducer elements to empower the electroconductive and catalyt-

ic properties of the electrode surface, allowing fast electron-transfer processes and easy transformation of the analytes at the sensing interface.^[5] In addition, large specific surface areas in nanomaterials favor a high load of analytical bioreceptors, which can be properly immobilized through prior modification of the nanomaterial surface with selected ligands.^[6] Nanomaterials engineering also offers the possibility to design advanced nanocomposite and hybrid nanomaterials with tailor-made properties. Accordingly, a great number and variety of electrochemical biosensors based on metal and metal-oxide nanoparticles, carbon nanotubes, graphene, quantum dots, and other nanomaterials have been constructed for food analysis purposes.^[4a,5a,7]

In this work, we describe the assembly of a novel bienzyme electrochemical biosensors, using a nanocomposite material of single-walled carbon nanotubes (CNTs) and gold–mesoporous silica Janus nanoparticles (JNP). The rationale of the nanocomposite design was based on the use of CNTs as a highly conductive, electrocatalytic, and matrix-forming 3D transducer material^[8] in combination with Janus colloids as a nano-engineered support for the toposelective co-immobilization of the enzymes. In fact, JNPs offer the advantage of two different faces with different chemical compositions (Au and silica nanoparticle faces), allowing selective immobilization of complementary bioreceptors on these faces by using different specific ligands (thiol and silane derivatives) and different linking strategies.^[9] In this particular case, a proof-of-concept was demonstrated by immobilizing glucose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4) and horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) to prepare a glucose biosensor. An important advantage of this biosensor design is the possibility to first immobilize the enzymes on JNPs and then further assemble the biosensor interface by deposition

[a] A. Boujakhrou,⁺ E. Sánchez,⁺ P. Díez, Dr. A. Sánchez, Prof. C. Parrado, Prof. J. M. Pingarrón, Dr. R. Villalonga
Department of Analytical Chemistry
Complutense University of Madrid
28040 Madrid (Spain)
E-mail: rvillalonga@quim.ucm.es
pingarro@quim.ucm.es

[b] Prof. P. Martínez-Ruiz
Department of Organic Chemistry I
Complutense University of Madrid
28040 Madrid (Spain)

[*] These authors contributed equally to this work

onto the CNT-coated electrode surface, thus avoiding loss of enzyme activity through direct immobilization on the nanostructured electrode surface. In addition, the presence of Au colloids in the JNPs should contribute to the electroconductive and catalytic properties of the CNT-modified sensing surface.

We recently reported the preparation of original JNPs that have been successfully employed to design advanced nanomachines for drug delivery and for biorecognition-labeling elements in affinity biosensing.^[10] However, the use of these anisotropic colloids as tailored supports for the co-immobilization of two complementary enzymes to design electrochemical biosensors has not yet been described.

2. Results and Discussion

Figure 1 shows the steps involved in the preparation of the biofunctionalized JNPs and their use in the assembly of the nanostructured bienzyme electrode. JNPs with an average size of 104 ± 17 nm were first prepared through a masking approach^[10] and used as a tailored support for the covalent immobilization of the two redox enzymes involved in the construction of the bienzyme biosensor for D-glucose. A representative TEM image of these nanoparticles is provided as an inset in Figure 1.

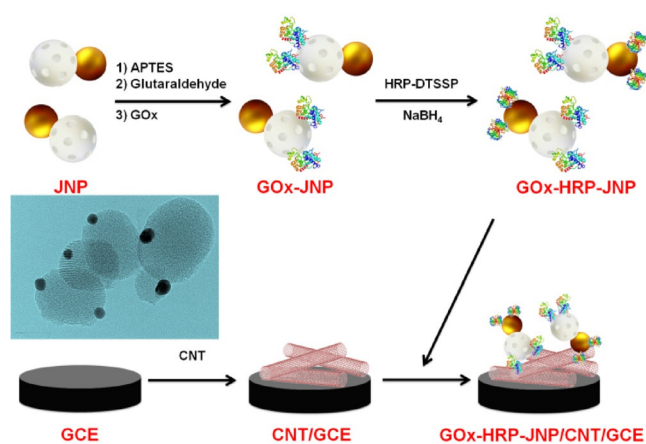


Figure 1. Schematic display of the steps involved in the assembly of the GOx-HRP-JNP/CNT/GCE bienzyme biosensor.

In this approach, we take advantage over the anisotropic chemical properties of JNPs for the toposelective assembly of these catalytic bioreceptors on the two different faces of the nanoparticles. In this sense, the D-glucose-transforming enzyme GOx was covalently immobilized on the mesoporous silica face of the JNPs, whereas the gold surface was biofunctionalized with HRP to catalyze the transformation of H_2O_2 produced from the GOx-mediated oxidation of the monosaccharide. We ensure the use of low working potentials for the amperometric detection of D-glucose, thus avoiding the undesirable effect of possible interfering compounds by using this bienzyme design. A high enzyme/JNP ratio was employed during the immobilization steps to ensure maximum enzyme loadings in the resulting nanocatalysts. Under these conditions,

the amount of GOx and HRP immobilized on the JNPs was estimated to be 3.1 and 2.2 Units per milligram of nanoparticles, respectively, by using conventional spectrophotometric methods for enzyme assays. It should be highlighted that the immobilized enzymes retained full activity for at least 1 month when stored at 4°C in the buffer solution, thus demonstrating that JNPs are excellent building blocks for the covalent immobilization of these redox enzymes. In addition, the detected GOx activity was approximately three times lower in control JNPs in which HRP and GOx were toposelectively immobilized on the mesoporous silica and Au nanoparticle faces, respectively.

Biofunctionalized JNPs were further employed as active elements for the design of an electrochemical biosensor for D-glucose. Figure 2 shows cyclic voltammograms recorded at a glassy carbon electrode (GCE) modified with different nanomaterials, before and after addition of H_2O_2 or D-glucose at a final concentration of 3 mM. Functionalization of the GCE with the bienzyme-functionalized JNPs resulted in a sensing surface that exhibited a very low background current (Figure 2A-a). In addition, this electrode exhibited low response toward H_2O_2 and D-glucose (Figures 2A-b and 2A-c, respectively), which could be ascribed to the low stability of the JNP/GCE interface, allowing the release of enzyme-modified colloids from the electrode surface during the assembly process.

As expected, a considerably larger background current was observed at the CNT-modified electrode (Figure 2B-a), which can be attributed to the much larger active surface area of nanotubes electrically connected to the electrode surface.^[11] A small voltammetric response was observed after addition of H_2O_2 (Figure 2B-b), which could be ascribed to the electrocatalytic properties of the CNTs.^[8] However, no significant response was apparent in the presence of glucose (Figure 2B-c). Conversely, a notable increase in the cathodic current was observed at the electrode modified with the GOx-HRP-JNP/CNT biocomposite material after addition of H_2O_2 and D-glucose (Figure 2C-b and 2C-c, respectively). This suggested the formation of a stable and electrocatalytically active sensing interface as a consequence of the strong interaction between the CNT/enzyme-modified Janus colloids and the electrocatalytic transformation of H_2O_2 and D-glucose.

Figure 3 shows a representative field-emission SEM (FESEM) image of the resulting nanocomposite material deposited on a GCE. As can be observed, the CNT-modified surface was largely loaded with JNPs. In addition, the JNPs seem to be captured in the CNT matrix after deposition on the electrode surface, probably by swelling of the oxidized CNT network during the assembly process. This mixed JNP/CNT matrix should provide stability to the sensing surface, and could favor fast electron transfer during the electrocatalytic transformation of the enzyme substrates, in agreement with the cyclic voltammetric results. Accordingly, this electrode architecture was evaluated for the construction of an amperometric biosensor for D-glucose.

To optimize the sensing interface, the influence of the experimental variables affecting the amperometric response of the nanostructured bienzyme electrodes towards D-glucose was in-

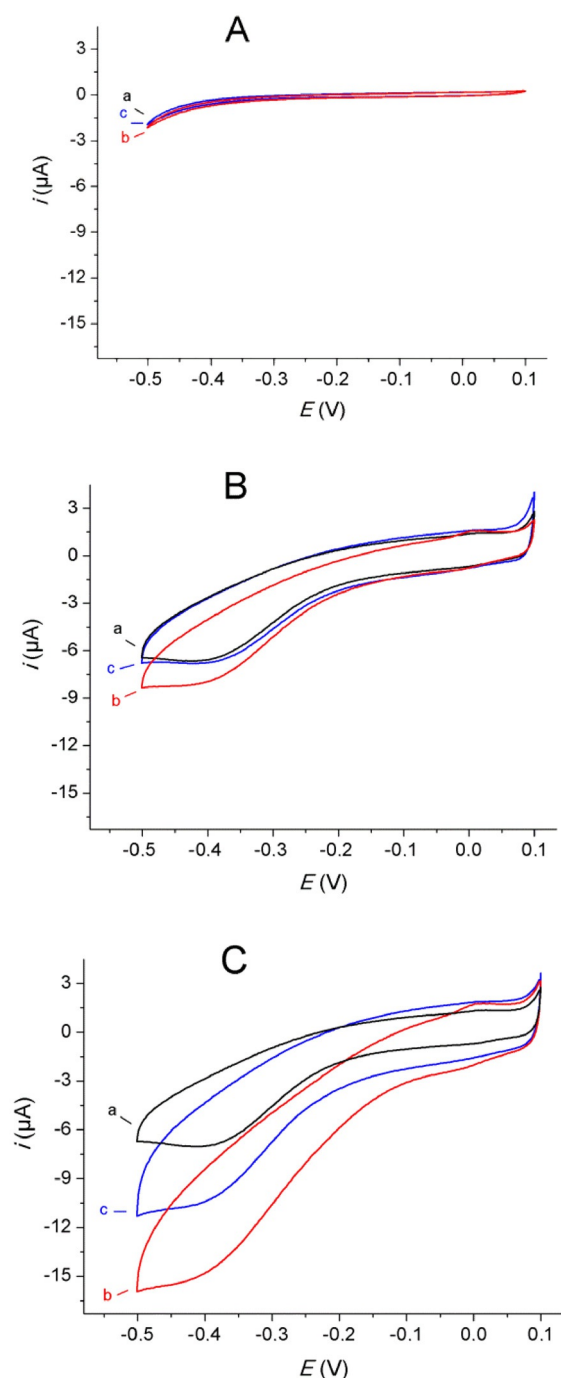


Figure 2. Cyclic voltammograms recorded in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0, containing 1 mM hydroquinone at a GCE modified with GOx-HRP-JNPs (A), CNTs (B), and GOx-HRP-JNP/CNT/GCE (C) in the absence (a) and the presence of 3 mM H_2O_2 (b) and D-glucose (c). Scan rate: 50 mV s^{-1} .

investigated. Figure 4A shows the effect of the CNT loading on the amperometric response of the electrode upon addition of $3 \mu\text{M}$ D-glucose, using -100 mV as the detection potential. The measured current in stirred buffer solutions increased with CNT loadings up to $4 \mu\text{g}$ and reached a constant value for larger CNT contents. Furthermore, the largest amperometric response was achieved when $40 \mu\text{g}$ of enzyme-modified JNPs were loaded on the CNT-coated electrode (Figure 4B). Accord-

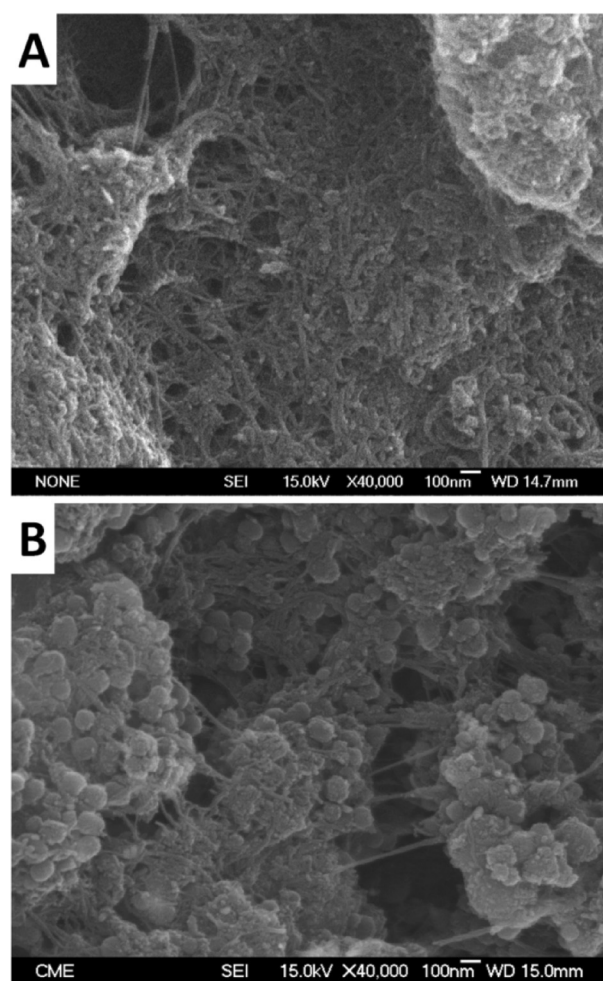


Figure 3. FESEM images of the CNTs (A) and GOx-HRP-JNP/CNT composite (B) on GCEs.

ingly, these values were used as optimized parameters for the assembly of the bienzyme electrode.

It should be also highlighted that these JNPs with respective HRP- and GOx-modified faces showed an analytical response that was approximately 2.4 times higher than control JNPs provided with HRP at the mesoporous silica face and GOx at the Au surface. This could be ascribed to the higher surface area of the mesoporous silica nanoparticles, ensuring a high load of GOx. In addition, immobilization of HRP on the conductive Au face should allow easy and fast electron transfer to the transducer surface during the biosensing process.

The assembly of this sensing surface was confirmed by using electrochemical impedance spectroscopy with $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ as the redox probe. The Nyquist plots of the different electrode configurations (Figure 5) showed that modification of the bare electrode with CNTs resulted in a dramatic reduction in the electron-transfer resistance, as a consequence of the high electroconductive properties of these carbon nanomaterials. However, as expected, deposition of the enzyme-modified JNPs caused a noticeable increase in the electron-transfer resistance ($R_{\text{et}} = 1564 \Omega$, curve c), suggesting partial blocking of the carbon nanomaterial with the nonconductive anisotropic colloids.

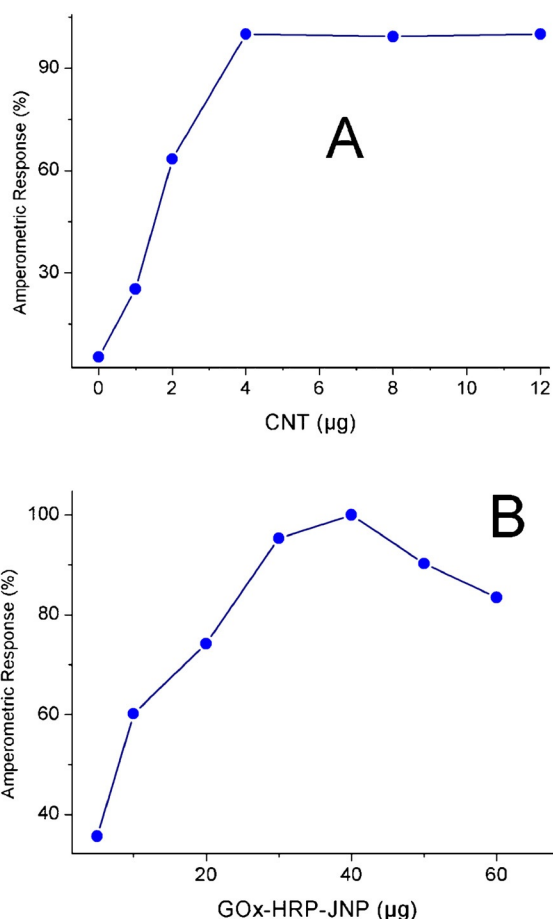


Figure 4. Effect of CNT (A) and GOx-HRP-JNP (B) loading on the amperometric response of the GOx-HRP-JNP/CNT/GCE toward 3 μM D-glucose.

To assess the optimal working conditions for the bienzyme biosensor, we further evaluated the influence of the applied potential and the pH value of the buffer solution on the amperometric response of the bienzyme electrode towards D-glucose. Figure 6A shows that the nanostructured electrodes exhibited a high analytical response when the working potential was fixed at -100 mV. On the other hand, a bell-shaped curve was observed for the amperometric response of the electrode versus the pH value, with the largest current appearing at pH 6.0 (Figure 6B). Accordingly, these values were employed as optimal working parameters for further experiments.

The amperometric response of the GOx-HRP-JNP/CNT/GCE biosensor upon continuous addition of D-glucose is shown in Figure 7A. The biosensor exhibited a fast response, reaching 95% of the steady-state current within 6 s of the addition of D-glucose. The cathodic response of the biosensor was linear, within the wide range of 490 nM to 600 μM of D-glucose ($r = 0.9996$, $n = 10$), as illustrated in Figure 7B. This linear behavior was adjusted by using Equation (1):

$$i_c [\text{mA}] = 4.37 \times c(\text{glucose} [\text{M}]) + 5 \cdot 10^{-6} \quad (1)$$

The detection limit achieved with this biosensor was calculated to be 360 nM, according to the $3SD/m$ criterion, where m

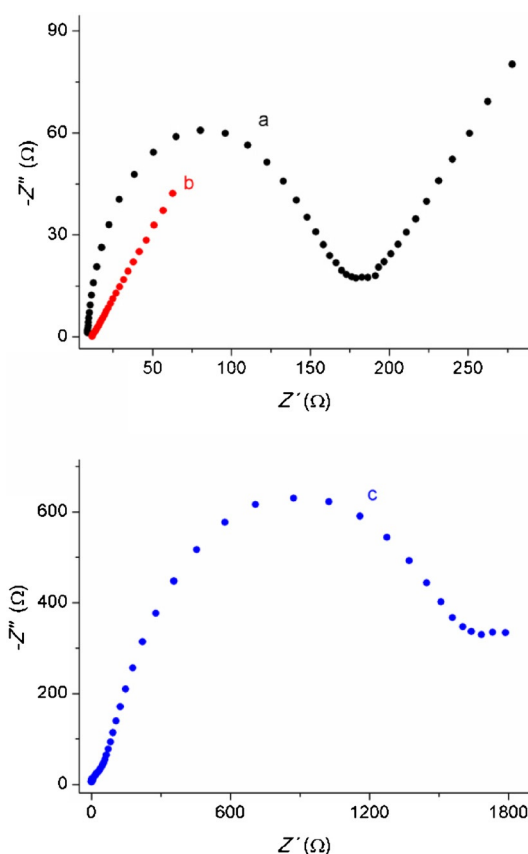


Figure 5. Nyquist plots ($-Z''$ vs. Z') for the electrochemical impedance spectroscopy measurements at the GCE before (a) and after sequential functionalization with CNTs (b) and GOx-HRP-JNP (c) in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1).

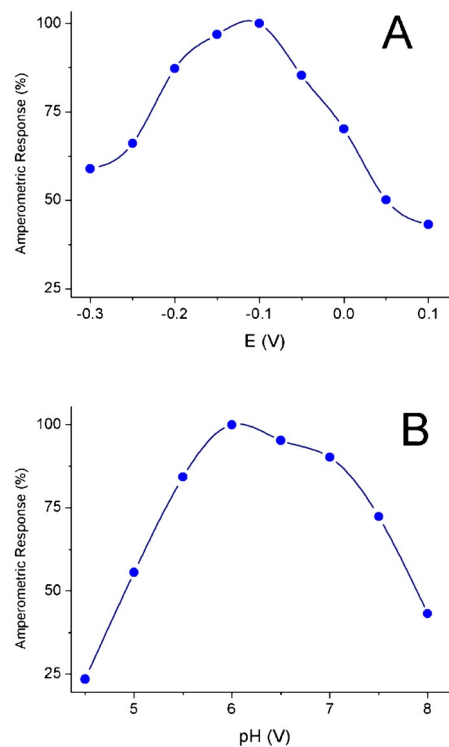


Figure 6. Effect of applied potential (A) and pH (B) on the amperometric response of the GOx-HRP-JNP/CNT/GCE toward 3 μM D-glucose.

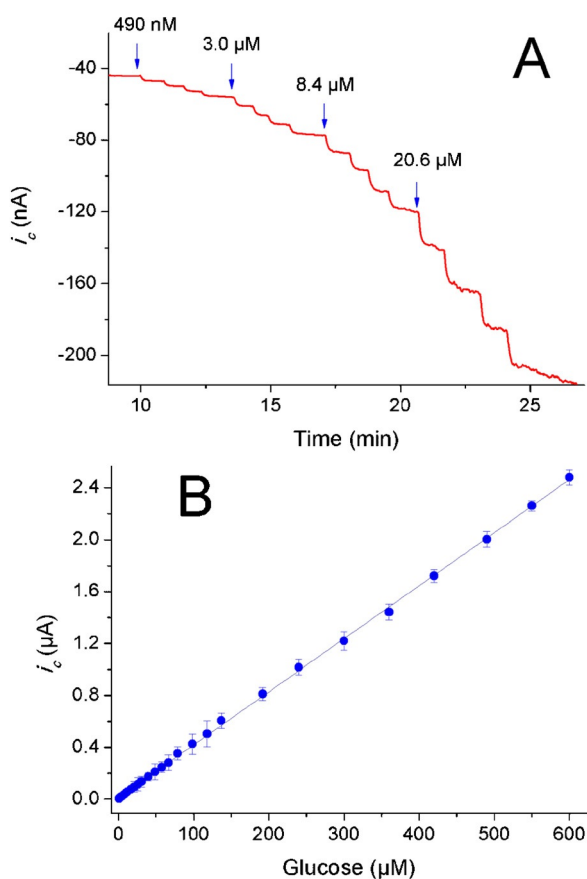


Figure 7. Amperometric response (A) and calibration curve (B) for glucose obtained with the GOx–HRP–JNP/CNT/GCE biosensor.

is the slope of the linear calibration graph and SD is the standard deviation for ten different amperometric measurements of 490 nM D-glucose. The JNP-based enzyme biosensor also showed a very high sensitivity of $62.43 \text{ mA m}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. As can be deduced from the data summarized in Table 1, these analytical characteristics are noticeably better than those recently reported for other enzyme biosensors involving nanostructured electrodes. In fact, the achieved detection limit is the lowest, although the sensitivity in terms of the slope of the calibration graph is slightly lower than that reported for biosensors involv-

ing catalytic Pt nanoparticles into the transducer material,^[7e,f] suggesting that the JNP/CNT composite nanomaterial designed here is an excellent transduction element for electrochemical biosensors.

The JNP/CNT matrix also seems to offer an adequate micro-environment for the catalytic action of GOx, considering the value of the estimated apparent Michaelis–Menten constant (K_M^{app}) for this immobilized enzyme. In this sense, the value calculated for $K_M^{\text{app}} = 1.3 \text{ mM}$ of GOx was lower than that reported for the free D-glucose-transforming enzyme ($K_M = 33 \text{ mM}$).^[12]

To evaluate the repeatability of the measurements, ten different tests for 3.0 μM D-glucose were performed with the same biosensor, yielding a relative standard deviation value of 5.9%. Moreover, the electrode-to-electrode reproducibility was estimated as 8.6% by using ten equivalently prepared electrodes to quantify D-glucose at the same concentration.

The long-term stability of the biosensor was tested by storing the electrode at 4 °C under dry conditions. The amperometric response of the electrode toward 3.0 μM D-glucose was periodically measured over a duration of 1 month. The enzymatic electrode retained about 98% of the initial response after 15 days of storage, as shown in Figure 8. Longer storage times produced a significant loss of activity, according to pseudo-first order kinetics, retaining about 64% of the initial activity after 1 month of storage. This could be associated with the irreversible inactivation/denaturation of the immobilized enzymes upon repeated use in a reaction media where the oxidant H_2O_2 is produced. Although this storage stability is sufficient for practical applications of the biosensor in food analysis, superior stability has been reported for other GOx-based biosensors.^[7b,c]

The selectivity of the biosensor was evaluated by measuring 3 μM D-glucose solutions in the presence of five possible interfering substances: D-galactose, D-sucrose, L-arabinose, D-fructose, and ascorbic acid. The biosensor showed good selectivity, because it was not affected by other sugars at a tenfold higher concentration. However, ascorbic acid at 1.0 μM caused interference in the quantification of D-glucose, with an increase in the cathodic current of about 38%. This could limit the application of the biosensor in the analysis of food samples in which ascorbic acid is employed as a preservative.

Table 1. Comparison of the analytical characteristics of the biosensor with those previously reported for other D-glucose nanostructured electrochemical biosensors.

Electrode ^[a]	Linear range [μM]	Detection limit [μM]	Sensitivity [$\text{mA m}^{-1} \text{ cm}^{-2}$]	K_M [mM]	Ref.
GOx/rGO–MWCNT/GCE	10–6500	4.7	7.95	–	[7b]
GOx/AuNPs/G/MWCNT/GCE	5–175	4.8	29.72	2.09	[7c]
GOx/MWCNT–SnS ₂ /Nafion/GCE	20–1950	4.0	21.65	2.71	[7d]
GOx–CS/Nafion/PtPd–MWCNT/GCE	62–14070	31	112	3.3	[7e]
GOx–Ada/CD–PAMAM/PtNP/Au	5–705	2.0	197	0.5	[7f]
GOx/PtNPs/PAMAM–rGO/GCE	10–8100	0.8	24.6	6.9	[7g]
GOx/rGO/GCE	100–27000	100	1.85	–	[7h]
GOx–Fe ₃ O ₄ @Au/SPCE(MnO ₂)	200–9000	100	2.52	–	[7i]
GOx–HRP–JNP/CNT/GCE	0.49–600	0.36	62.43	1.3	this work

[a] rGO: reduced graphene oxide; MWCNT: multi-walled carbon nanotubes; AuNPs: Au nanoparticles; G: graphene; SnS₂: SnS₂ nanoflakes; CS: chitosan; PtPd: Pt–Pd nanoparticles; Ada: adamantane; CD: cyclodextrin; PAMAM: polyamidoamine G-4 dendron/dendrimer; PtNP: Pt nanoparticles; Fe₃O₄@Au: Au seeds decorated Fe₃O₄ nanoparticles; SPCE(MnO₂): MnO₂-modified carbon screen-printed electrodes.

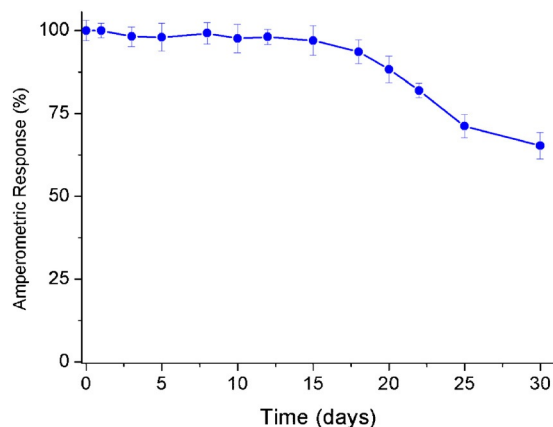


Figure 8. Long-term stability of the GOx-HRP-JNP/CNT/GCE biosensor upon storage at 4 °C in dry conditions.

The potential usefulness of the bienzyme biosensor was checked by analyzing the D-glucose content in commercial soft drinks (Pepsi and Kas, PepsiCo Inc.). In both cases, the standard additions method was employed to minimize matrix effects, and an appropriate sample dilution was also performed. The electroanalytical results were compared with those obtained with a commercial colorimetric kit for D-glucose, based on coupled bienzymatic reactions catalyzed by hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma). As can be observed in Table 2, there is excellent agreement between both values, demonstrating the analytical reliability of the JNP-based biosensor to quantify D-glucose in commercial food samples.

Sample	D-Glucose [g/100 mL]		Recovery [%]
	Colorimetric	Electrochemical	
Pepsi	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.4	104.8
Kas	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.3	97.4

3. Conclusions

Herein, we described the first use of Janus Au-mesoporous silica nanoparticles as anisotropic supports for the toposelective co-immobilization of two complementary redox enzymes. This functionalized nanomaterial was combined with single-walled carbon nanotubes to design a composite nanomaterial for electroanalytical purposes. The resulting composite nanomaterial demonstrated its usefulness as an electrochemical transducer for the design of amperometric bienzyme biosensors, which were exemplified by constructing a biosensor for D-glucose that exhibited excellent analytical performance in terms of high sensitivity and stability along with low detection limit. This biosensor was also validated with real samples by determining the content of D-glucose in commercial soft drinks. Our results suggest that multi-faced, engineered nanoparticles could open new possibilities for the design of advanced and tailor-made biofunctionalized nanomaterials for electroanalytical applications.

Experimental Section

Reagents and Apparatus

Glucose oxidase (GOx, Type VII, 150 U mg⁻¹), horseradish peroxidase (HRP, Type II, 250 U mg⁻¹), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), tetraethoxysilane (TEOS), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane, HAuCl₄, NaBH₄, trisodium citrate, paraffin wax, 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP), and glutaraldehyde were acquired from Sigma-Aldrich Co. (USA). CNTs were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan). All other chemicals were of analytical grade.

Amperometric measurements were performed with an ultrasensitive Inbea potentiostat (Inbea Biosensores S.L., Spain). Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy experiments were performed by using a FRA2 μAutolab Type III potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands). A conventional three-electrode system was employed in all electrochemical studies. The working electrode was a glassy carbon electrode (GCE, 3.0 mm diameter) modified with CNTs and the JNPs with the immobilized enzymes. An Ag/AgCl/KCl (3 M) and a Pt wire were used as reference and counter electrodes, respectively. The measurements with the biosensor were carried out at 25 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 (working volume 10 mL), by using 1 mM hydroquinone as an electrochemical mediator. Stock solutions of D-glucose (1 μM to 100 mM) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, were freshly prepared.

TEM was performed with a JEOL JEM-2100 microscope (Jeol Ltd., Japan). High-resolution FESEM was performed with a JEOL JSM-6335F microscope (JEOL Ltd., Japan).

Preparation of the JNPs

The anisotropic nanoparticles were prepared as previously described.^[10] Briefly, mesoporous silica nanoparticles were first prepared by dissolving CTAB (0.5 g) in water (240 mL) with sonication. A 2.0 M NaOH solution (10.5 mL) was then added and the temperature of the mixture was adjusted to 80 °C. Tetraethoxysilane (2.5 mL) was added dropwise to the surfactant solution with vigorous magnetic stirring. The mixture was allowed to react for 2 h. The resulting white solid was filtered, washed with water and methanol, and dried in a desiccator. Finally, the solid was calcined at 550 °C for 5 h to remove the organic template.

To prepare the Au-mesoporous silica JNPs, mesoporous silica nanoparticles (200 mg) were dispersed in 1.0 μM CTAB (10 mL) in aqueous 6.7% ethanol solution. The mixture was heated at 75 °C, and then paraffin wax (1.0 g) was added. When the paraffin wax was melted, the mixture was vigorously stirred at 25 000 rpm for 10 min by using an Ultra-Turrax T-18 homogenizer (IKA, Germany). The resulting emulsion was further stirred for 1 h at 4000 rpm and 75 °C by using a magnetic stirrer. The resulting Pickering emulsion was then cooled to room temperature, mixed with methanol (10 mL), and treated with (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (200 μL). After 3 h under magnetic stirring, the silanized emulsion was filtered, washed three times with methanol, and further dispersed in 3.0 μM of 20 nm citrate-capped Au nanoparticles (400 mL), which were freshly prepared according to the Frens method.^[13] The mixture was stirred overnight, filtered, and washed extensively with ultrapure water. The solid was suspended in ethanol, centrifuged, and washed twice with ethanol and three times with chloroform to remove the paraffin wax. The resulting JNPs were finally dried and kept in desiccators until use.

Co-immobilization of GOx and HRP on JNPs (GOx–HRP–JNPs)

JNPs (100 mg) were dispersed in methanol (100 mL) and mixed with APTES (100 μ L). After 3 h of continuous stirring, the solid was filtered, washed with methanol, and dried. The APTES-modified nanoparticles (3.0 mg) were dispersed in 50 mM sodium phosphate buffer (1.0 mL), pH 6.0, and treated with glutaraldehyde (5% v/v, final concentration) for 1 h whilst stirring in the dark. The activated nanoparticles were collected by centrifugation, washed with buffer solution, and dispersed in 2.0 mL of the same buffer. GOx (6.0 mg) was further added and the mixture was stirred in an ice bath for 1 h. The resulting colloid (GOx–JNPs) was collected by centrifugation, washed with cold buffer solution, and then dispersed in 2.0 mL of buffer.

In parallel, HRP (6.0 mg) and DTSSP (6.0 mg) were dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (2.0 mL), pH 6.0, and stirred for 2 h at 4 °C. Thereafter, 100 mM NaBH₄ solution (20 μ L) was added and the mixture was stirred at 4 °C for 30 min. The solution was dialyzed versus 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. The resulting thiolated enzyme was diluted in 1.0 mL of the same buffer and then added to 2.0 mL of sodium phosphate buffer, pH 6.0, containing 3.0 mg of GOx–JNPs, and stirred at 4 °C for 1 h. The resulting solid (GOx–HRP–JNPs) was isolated by centrifugation, washed several times, dispersed in 1.0 mL of the same cold buffer solution, and kept in a refrigerator until use. The immobilized enzyme activities were estimated by conventional spectrophotometric assays, using H₂O₂ and [2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] as substrates for HRP,^[14] and D-glucose substrate coupled with the HRP enzymatic assay for GOx determination.^[15]

Preparation of the Enzymatic Electrode

CNTs were first purified and partially oxidized by treating them with a mixture of HNO₃/H₂SO₄ (3:1, v/v) for 2 h in an ultrasonic bath. The treated CNTs were centrifuged, washed with double distilled water until achieving a neutral pH, and finally dried in vacuum under P₂O₅.

To assemble the bienzyme electrode, a bare GCE was polished to a mirror-like surface with alumina powder (0.3 μ m), rinsed thoroughly with double-distilled water, successively washed with double distilled water, anhydrous ethanol, and acetone in an ultrasonic bath, and finally dried under N₂ before use. Coating of the polished GCE was accomplished by depositing a 0.4 mg mL⁻¹ CNT aqueous dispersion (10 μ L) on the electrode surface and allowing it to dry. GOx–HRP–JNPs were then deposited on the modified electrode by dropping a 3 mg mL⁻¹ GOx–HRP–JNP dispersion (20 μ L) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, and drying at 4 °C. The electrode was then washed several times with cold 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, and finally stored in refrigerator until use (GOx–HRP–JNP/CNT/GCE).

Acknowledgements

R.V. acknowledges a Ramón & Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2014–58989, CTQ2011–24355, CTQ2012–34238) and Comunidad de

Madrid (S2013/MIT-3029), Programme NANOAVANSENS is gratefully acknowledged.

Keywords: biosensors • carbon nanotubes • enzymes • glucose • Janus nanoparticles

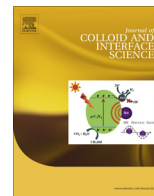
- [1] a) M. Śliwińska, P. Wiśniewska, T. Dymerski, J. Namieśnik, W. Wardencki, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1423–1448; b) B. B. Dzantiev, N. A. Byzova, A. E. Urusov, A. V. Zherdev, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *55*, 81–93; c) M. Mezcua, M. A. Martínez-Uroz, M. M. Gómez-Ramos, M. J. Gómez, J. M. Navas, A. R. Fernández-Alba, *Talanta* **2012**, *100*, 90–106.
- [2] a) J. Rubert, C. Soler, J. Mañes, *Food Chem.* **2012**, *133*, 176–183; b) G. Raber, N. Stock, P. Hanel, M. Murko, J. Navratilova, K. A. Francesconi, *Food Chem.* **2012**, *134*, 524–532; c) J. Bernal, A. M. Ares, J. Pól, S. K. Wiedmer, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7438–7452.
- [3] a) T. F. McGrath, C. T. Elliott, T. L. Fodey, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 75–92; b) X. Xu, Y. Ying, *Food Rev. Int.* **2011**, *27*, 300–329; c) T. F. McGrath, K. Andersson, K. Campbell, T. L. Fodey, C. T. Elliott, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 96–102.
- [4] a) B. Pérez-López, A. Merkoçi, *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 625–639; b) R. Villalonga, C. Camacho, R. Cao, J. Hernández, J. C. Matías, *Chem. Commun.* **2007**, *9*, 942–944; c) R. Villalonga, M. L. Villalonga, P. Díez, J. M. Pingarrón, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12858–12864.
- [5] a) J. Wang, *Analyst* **2005**, *130*, 421–426; b) R. Villalonga, P. Díez, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 4672–4677.
- [6] a) R. Pilolli, L. Monaci, A. Visconti, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 12–26; b) R. Villalonga, P. Díez, S. Casado, M. Eguílaz, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Analyst* **2012**, *137*, 342–348.
- [7] a) S. N. A. Mohd Yazid, I. Md Isa, S. Abu Bakar, N. Hashim, S. Ab Ghani, *Anal. Lett.* **2014**, *47*, 1821–1834; b) V. Mani, B. Devadas, S. M. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 309–315; c) Y. Yu, Z. Chen, S. He, B. Zhang, X. Li, M. Yao, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 147–152; d) J. Li, Z. Yang, Y. Tang, Y. Zhang, X. Hu, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 698–703; e) K. J. Chen, C. F. Lee, J. Rick, S. H. Wang, C. C. Liu, B. J. Hwang, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *33*, 75–81; f) P. Díez, C. G. Piuleac, P. Martínez-Ruiz, S. Romano, M. Gamella, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3773–3781; g) E. Araque, C. B. Arenas, M. Gamella, J. Reviejo, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *717*, 96–102; h) B. Unnikrishnan, S. Palanisamy, S. M. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *39*, 70–75; i) A. Samphao, P. Butmee, J. Jitcharoen, L. Švorc, G. Raber, K. Kalcher, *Talanta* **2015**, *142*, 35–42.
- [8] W. Yang, K. R. Ratnac, S. P. Ringer, P. Thordarson, J. J. Gooding, F. Braet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2114–2138; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2160–2185.
- [9] S. Jiang, Q. Chen, M. Tripathy, E. Luijten, K. S. Schweizer, S. Granick, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1060–1071.
- [10] a) A. Sánchez, P. Díez, P. Martínez-Ruiz, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, *Electrochem. Commun.* **2013**, *30*, 51–54; b) R. Villalonga, P. Díez, A. Sánchez, E. Aznar, R. Martínez-Mañez, J. M. Pingarrón, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7889–7894; c) P. Díez, A. Sánchez, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, E. Aznar, C. de La Torre, J. R. Murguía, R. Martínez-Mañez, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9116–9123.
- [11] T. L. Lu, Y. C. Tsai, *Sens. Actuators B* **2010**, *148*, 590–594.
- [12] B. E. P. Swoboda, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2209–2215.
- [13] G. Frens, *Nature* **1972**, *241*, 20–22.
- [14] B. Morawski, Z. Lin, P. Cirino, H. Joo, G. Bandara, F. H. Arnold, *Protein Eng. Des. Sel.* **2000**, *13*, 377–384.
- [15] R. C. Bateman Jr, J. A. Evans, *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, A240–A241.

Manuscript received: June 6, 2015

Revised: July 13, 2015

Accepted Article published: July 29, 2015

Final Article published: August 19, 2015



Regular Article

Gold nanoparticles-decorated silver-bipyridine nanobelts for the construction of mediatorless hydrogen peroxide biosensor



Abderrahmane Boujakhrouit^a, Paula Díez^{a,*}, Alfredo Sánchez^a, Paloma Martínez-Ruiz^b, José M. Pingarrón^a, Reynaldo Villalonga^{a,*}

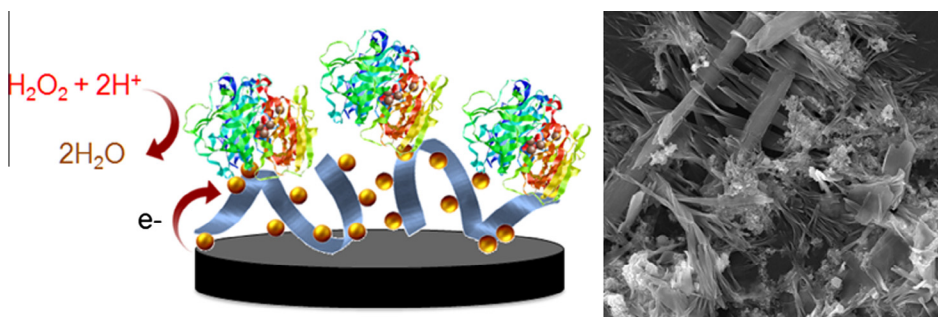
^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Novel gold nanoparticles decorated silver-bipyridine nanobelts are reported.
- Decorated nanobelts showed high electrocatalytic activity toward H₂O₂.
- A sensitive nanostructured enzyme biosensors for H₂O₂ is reported.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2016

Revised 27 July 2016

Accepted 28 July 2016

Available online 29 July 2016

Keywords:

Biosensor

Gold nanoparticles

Peroxidase

Nanobelts

Hydrogen peroxide

ABSTRACT

Au nanoparticles modified with 4-mercaptopyridine and 6-mercapto-1-hexanol were used as coordination agents to prepare a novel hybrid nanomaterial with Ag:4,4'-bipyridine nanobelts. This nanohybrid was employed to modify glassy carbon electrodes and to construct a horseradish peroxidase-based mediatorless amperometric biosensor for H₂O₂. The electrode, poised at –100 mV, exhibited a rapid response within 4 s and a linear calibration range from 90 pM to 6.5 nM H₂O₂. The biosensor showed a high sensitivity of 283 A/M cm² and a very low detection limit of 45 pM at a signal-to-noise ratio of 3. The enzyme biosensor showed high stability when stored at 4 °C under dry conditions, retaining over 96% and 78% of its initial activity after 15 and 30 days of storage at 4 °C, respectively.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Electrochemical enzyme biosensors are widely employed as highly selective analytical tools for biomedical, food quality assurance, clinical diagnosis and environmental monitoring [1,2]. In general, most of these biosensors devices need the use of electrochemical mediators to act as artificial electron

transferring agents between the enzyme redox centre and the electrode surface. These mediators allow reduction of the overpotential and, accordingly, minimization of potential interferences during measurement [3,4]. However, the use of electrochemical mediators implies somewhat complex electrode architectures, or even worse, the addition of these mediators to the measuring solution. Therefore, the design of novel nanostructured 3D transducer elements with improved electron transfer and electrocatalytic properties is a key factor to assemble simple, reliable and cost-effective third-generation enzyme biosensors.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: paula.diez@ucm.es (P. Díez), rvillalonga@quim.ucm.es (R. Villalonga).

Gold nanoparticles (AuNP) have been extensively employed in the preparation of electrochemical enzyme biosensors due to their unique characteristics such as high electroconductivity, surface energy and surface-to-volume ratio, electrocatalytic properties, ability to decrease proteins-metal particles distance, and the possibility to act as electroconductive wires between the electrode surface and the enzyme active site allowing direct electron transfer through a tunnelling mechanism [5]. In addition, tailor-made combination of AuNP with other micro- and nanosized materials has provided a large variety of advanced hybrid nanomaterials and nanocomposites with new and synergic properties for biosensing purposes [6–8].

AuNP have been directly employed as transducer elements in enzyme biosensor by modification of the electrode surface via covalent attachment, electrodeposition, electrostatic adsorption, electropolymerization or supramolecular association [9–12]. On the other hand, a great variety of functional biosensor interfaces has been designed by combining gold nanoparticles with carbon nanotubes [6,13], graphene derivatives [14,15], electroconductive polymers [7], dendrimers [16], metal and metal oxide nanostructures [12,17,18], polysaccharides [19], etc.

In this work we describe the synthesis of original bi-functionalized AuNP capped with 4-mercaptopyridine and 6-mercapto-1-hexanol residues, and its further use to prepare novel AuNP-decorated coordination polymer nanobelts by reaction with 4,4'-bipyridine and Ag^+ ions. This nanohybrid was successfully employed as wiring material for horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) to construct a highly sensitive mediatorless enzyme biosensor for hydrogen peroxide. The rationale of this research is supported by the well-known electrocatalytic properties of AuNP [20,21] and silver:bipyridine coordination polymers-based nanostructures [22], allowing us to envision a synergic electrocatalytic capacity for the resulting nanohybrid.

On the other hand, hydrogen peroxide was selected as target analyte due to its function as essential mediator in biology, medicine and chemistry, as well as its environmental impact as industrial waste. In addition, H_2O_2 is a by-product of highly selective oxidases commonly employed in enzyme biosensor design [23].

2. Materials and methods

2.1. Reagents and apparatus

Horseradish peroxidase (HRP, Type II, 10^5 U/mg), HAuCl_4 , NaBH_4 , AgNO_3 , 4-mercaptopyridine, 6-mercapto-1-hexanol and 4,4'-bipyridine were purchased from Sigma (USA). All other chemicals were of analytical grade.

Transmission electron microscopy (TEM) and high resolution field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) were performed with JEOL JEM 2100 and JEOL JSM-6335F microscopes, respectively (JEOL Ltd., Japan). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis was performed with a SPECS GmbH electron spectroscopy system provided with a PHOIBOS 150 9MCD analyser. Amperometric measurements were performed with an Inbea potentiostat (Inbea Biosensores S.L., Spain). Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) experiments were performed using a FRA2 μ Autolab Type III potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands). A conventional three-electrode system was employed in the electrochemical studies, where the working electrode was a glassy carbon electrode (GCE, 3.0 mm diameter) modified with the nanobelts and the immobilized enzyme. An $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ (3 M) and a Pt wire were used as reference and counter electrodes, respectively. The measurements with the biosensor were carried out at 25 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 (working volume 10 mL). The

solution was exhaustively de-aerated before each electrochemical experiment. The solutions were stirred at 300 rpm with a magnetic bar during amperometric measurements. For analytical purposes, 1 μM H_2O_2 solutions in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 were freshly prepared.

2.2. Synthesis of the functionalized AuNP

Bi-functionalized AuNP were prepared through a modification of our previously reported protocol [6,10]. Briefly, 50 mg of HAuCl_4 were dissolved in 12.7 mL of de-aerated DMSO. This solution was added dropwise to other 12.7 mL of de-aerated DMSO containing 60 mg sodium borohydride, 10 mg 4-mercaptopyridine and 36.2 mg 6-mercapto-1-hexanol under vigorous stirring. The reaction mixture turned deep brown immediately, but the reaction was continued for 24 h. The functionalized AuNPs were then precipitated by adding 25 mL CH_3CN , collected by centrifugation, and washed with 50 mL $\text{CH}_3\text{CN}:\text{DMSO}$ (1:1 v/v), 50 mL ethanol and 10 mL diethyl ether. The nanoparticles were finally isolated by centrifugation and dried under N_2 .

2.3. Preparation of the AuNP-NB hybrid nanomaterial

This hybrid nanomaterial was prepared by modification of the protocol reported for silver:bipyridine nanobelts [22]. Stock solutions of 10 mg/mL AuNP and 34 mg/mL AgNO_3 in double distilled water, and 13 mg/mL 4,4'-bipyridine in ethanol were freshly prepared. To prepare the AuNP-NB nanohybrid, 200 μL of AuNP solution were mixed with 1 mL AgNO_3 and 2 mL 4,4'-bipyridine stock solution under continuous stirring at room temperature. After 10 min, the resulting purple precipitate was centrifuged, two-times washed with ethanol and finally dispersed in ethanol up to 14 mg/mL final concentration.

2.4. Preparation of the nanostructured enzyme electrode

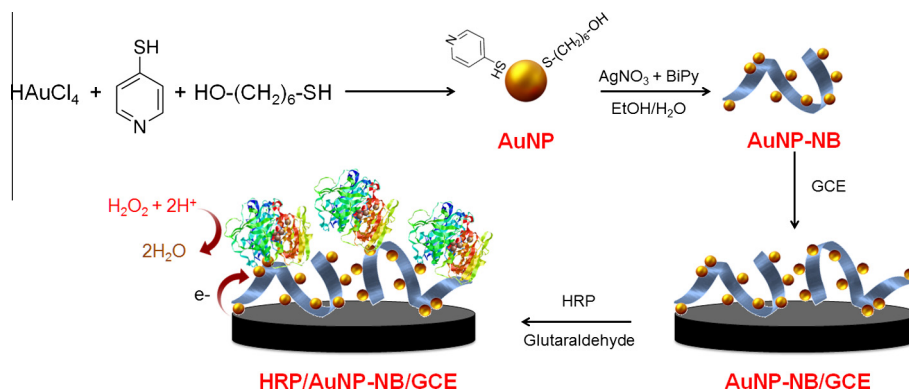
A polished GCE was first coated with the nanohybrid material by depositing 20 μL of the AuNP-NB ethanolic dispersion on the electrode surface and allowing drying. HRP was further immobilized on the nanostructured electrode by dropping 12 μL of a 10 mg/mL enzyme solution in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, and mixed with 2 μL of 25% (v/v) glutaraldehyde. The electrode was kept at 4 °C for 1 h, then washed several times with cold 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, dried and finally stored in refrigerator until use (HRP/AuNP-NB/GCE).

3. Results and discussion

The steps involved in the preparation of the hybrid nanomaterial and the HRP enzyme electrode is illustrated in Scheme 1. Gold colloids were first grown in the presence of two different thiol ligands, 4-mercaptopyridine and 6-mercapto-1-hexanol, yielding dark red¹ and water soluble nanoparticles. The bi-functionalized AuNP particles showed spherical geometry with an average diameter of 2.7 ± 0.9 nm, as determined by TEM (Fig. 1A). The radial geometry and small size exhibited by the nanoparticles resulted from the synthetic approach used, in which both metal reduction and attachment of thiolated ligands to the surface of the developing Au particles take place in the same step [10,24]. The size histogram for the AuNPs is reported in Fig. 1S (Supporting Information).

The selection of the two different thiol-derivatives used as capping ligands for the AuNPs was rational made according to the

¹ For interpretation of color in Scheme 1, the reader is referred to the web version of this article.



Scheme 1. Schematic display of the processes involved in the preparation of the AuNP-NB nanohybrid and assembly of the HRP enzyme biosensor.

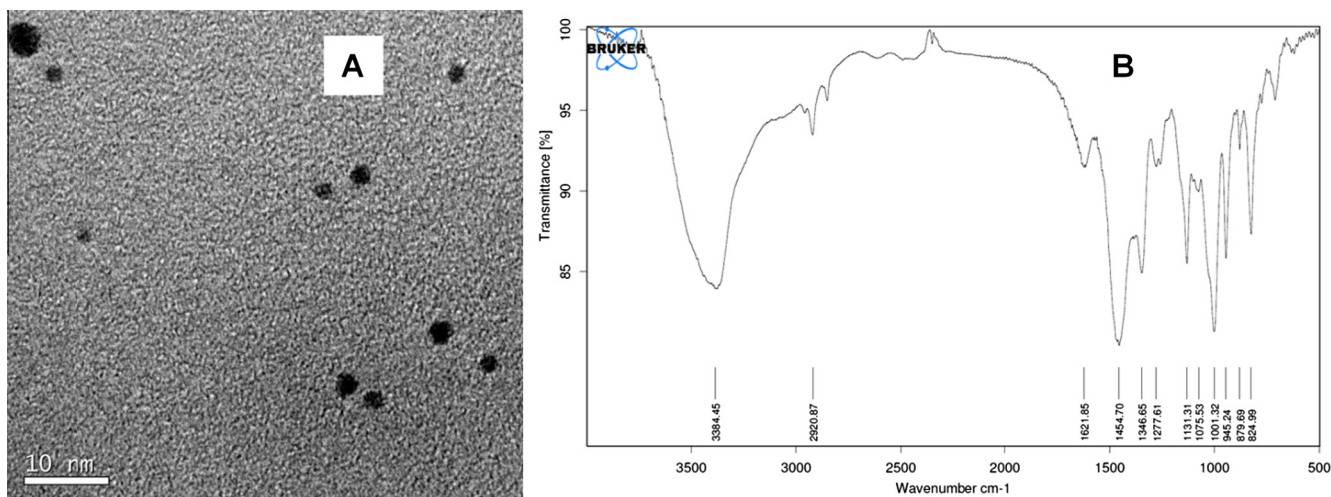


Fig. 1. TEM (A) and FT-IR (B) analysis of bi-functionalized Au nanoparticles.

desired properties to be conferred to the nanomaterial. In this sense, 4-mercaptopyridine acted as chelating agent able to coordinate silver ions, and accordingly, allowing the coordination of functionalized the AuNP to the silver:bipyridine nanobelts. On the other hand, 6-mercapto-1-hexanol should favour the solubilisation and colloidal stabilization of the resulting nanoparticles in aqueous solutions.

Bi-functionalized AuNP were characterized by FT-IR (Fig. 1B). The presence of 4-mercaptopyridine was confirmed by the peaks at 16254.85 cm^{-1} , 14554.70 cm^{-1} and 13476.64 cm^{-1} , corresponding to the symmetric wag-stretch, symmetric C–H wag and C–H wag in the aromatic pyridine ring, respectively. In addition, the presence 6-mercapto-1-hexanol was verified by the broad peak centered at 3384.45 cm^{-1} due to the stretching of the O–H groups, the peak at 29210.87 cm^{-1} corresponding to the stretching of the C–H groups, and the C–O stretching peak at 1001.32 cm^{-1} .

Functionalized AuNP were mixed with AgNO_3 and 4,4'-bipyridine, yielding a purple solid that can be easily suspended in ethanol. FE-SEM analysis revealed a fractal-like dendritic morphology for this nanomaterial, which was noticeably enriched with AuNP (Fig. 2A). Although bulky grouped nanoparticles were clearly observed, FE-SEM images at high magnification revealed that nanoparticles were attached to the nanobelt surface (Fig. 2B). This fact suggested partial coordination of functionalized AuNP to the silver:bipyridine nanobelts structure through bipyridine:silver:bipyridine linkages, and further formation of AuNP coordination adducts on this decoration sites. The effect of AuNP on the morphology of the decorated nanobelts can be easily visualized by comparison with FE-SEM image of non-doped silver:bipyridine coordination polymers (Fig. 2C), which showed the classical non-dendritic nanobelt morphology [22].

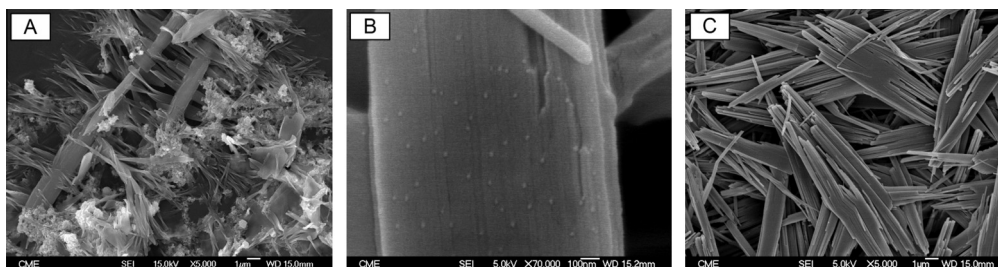


Fig. 2. Representative FE-SEM images of AuNP-NB nanohybrid at low (A) and high (B) magnification, and non-decorated silver:bipyridine nanobelts (C).

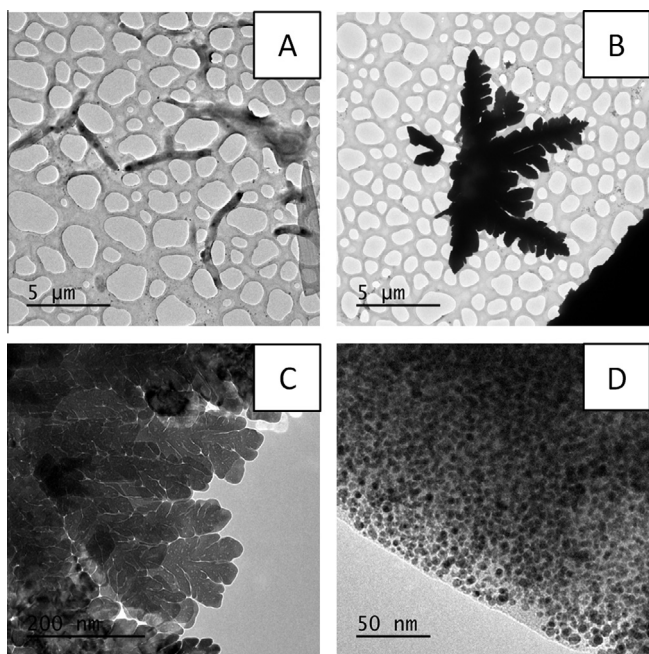


Fig. 3. Representative TEM images of non-decorated silver:bipyridine nanobelts (A) and AuNP-NB nanohybrid at different magnification (B–D).

These results were confirmed by TEM analysis, as is illustrated in Fig. 3. In contrast with non-doped nanostructures, which showed well-defined nanobelt morphology, AuNP-NB nanohybrid showed interesting fern-like fractal morphology with an average size of $11 \pm 4 \mu\text{m}$. TEM images at high magnification revealed a high content of AuNP homogeneously distributed into the nanohybrid structure. The size histogram for the AuNPs is reported in Fig. 1S (Supporting Information).

Z-potential analysis in milliQ water revealed values of +14.2 mV and +6.6 mV for non-doped silver:bipyridine coordination polymers and AuNP-NB nanohybrids, respectively.

The nanomaterials were characterized by XPS, and the corresponding spectra are shown in Figs. 2S–4S (Supporting Information). Polyfunctionalized AuNPs showed the characteristic peaks of Au^0 : the 4f doublet at 84.1 eV ($4f_{7/2}$) and 87.7 eV ($4f_{5/2}$), the 4d doublet at 368.2 eV ($4d_{5/2}$) and 374.1 eV ($4d_{3/2}$) and the component

$4p_{3/2}$ at 532.4 eV of the 4p doublet (Fig. 2S). On the other hand, the XPS spectrum of silver:bipyridine nanobelts in Fig. 3S is mainly characterized by the prominent 3d doublet at 371.4 eV ($3f_{5/2}$) and 377.3 eV ($3f_{3/2}$) of Ag^+ . These peaks are also clearly observed in the XPS spectrum of AuNP-NB (Fig. 4S), which were slightly shifted to 370.9 eV ($3f_{5/2}$) and 376.8 eV ($3f_{3/2}$) due to interaction with the chelating groups at the surface AuNPs. The presence of AuNPs in the nanohybrid was confirmed by the peaks at 87.3 eV ($4f_{7/2}$) and 90.9 eV ($4f_{5/2}$). This shifting in the 4d doublet suggests high perturbation of electrons at the AuNP surface, which could be caused by the proximity of silver ions attached to the mercaptopyrindine residues.

The hybrid nanomaterial was used to modify a GCE, on which HRP was covalently immobilized through a glutaraldehyde-mediated cross-linking reaction. The behaviour of the resulting enzyme electrode (HRP/AuNP-NB/GCE) was evaluated by cyclic voltammetry using H_2O_2 as substrate. As controls, GCE coated with AuNP-NB, AuNP, HRP/AuNP, NB and HRP/NB were also prepared. Fig. 4A compares cyclic voltammograms recorded at the HRP/AuNP-NB/GCE and AuNP-NB/GCE electrodes in a deaerated 0.1 M sodium phosphate buffer solution of pH 6.0 at a 50 mV/s scan rate, in the absence and the presence of added H_2O_2 . Similar study is shown in Fig. 5S (Supporting Information) for the AuNP/GCE and HRP/AuNP/GCE electrodes. No redox peaks were observed in the voltammograms recorded with the AuNP/GCE, NB/GCE and AuNP-NB/GCE, suggesting these nanomaterials were not electrochemically transformed under these conditions. A noticeable increase in the cathodic current was observed for the AuNP-NB/GCE control electrode after addition of H_2O_2 (black lines). This effect was significantly higher than that observed at a GCE only coated with silver:bipyridine NB (Fig. 4B, green lines, please note the different current scale) or AuNPs (Fig. 5S, Supporting Information). This fact clearly indicated the high electrocatalytic ability of the synthesized nanohybrid for the electrochemical reduction of H_2O_2 at the nanostructured electrode surface.

As expected, remarkably larger catalytic currents were found at the HRP/AuNP-NB/GCE electrode after addition of H_2O_2 (Fig. 4A, blue lines), which were also higher than those observed with the HRP/NB/GCE electrode (Fig. 4B, red lines), and the HRP/AuNP/GCE electrode (Fig. 5S, Supporting Information). These results demonstrated that the electrocatalytic behaviour of HRP was improved upon its immobilization on the AuNP-NB nanohybrid, allowing an efficient electron transfer between the redox active site of the enzyme and the electrode surface.

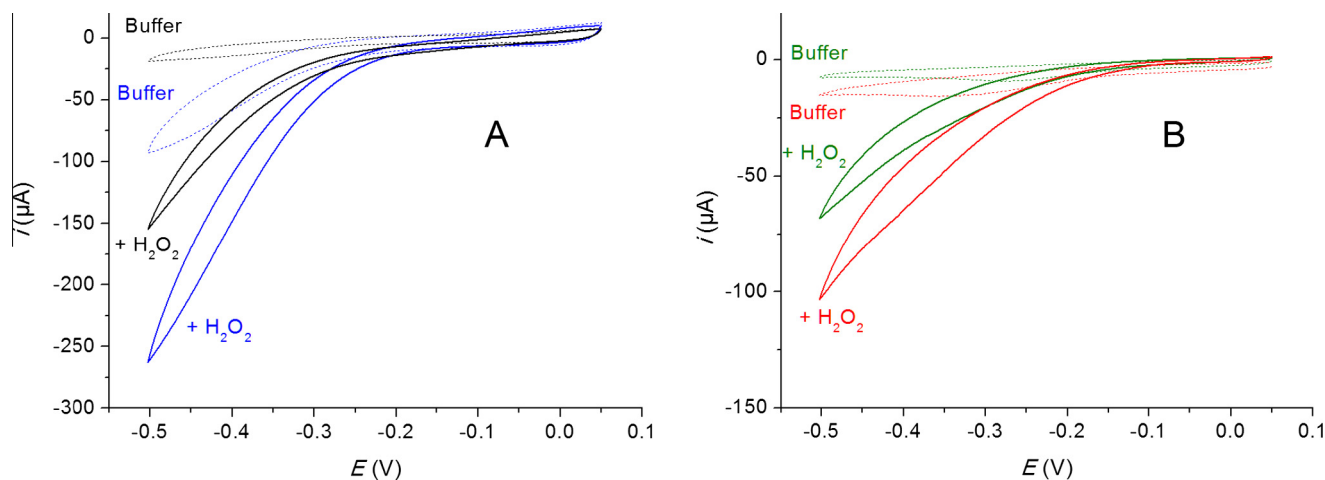


Fig. 4. Cyclic voltammograms recorded at the HRP/AuNP-NB/GCE (blue lines), AuNP-NB/GCE (black lines), NB/GCE (green lines) and HRP/NB/GCE (red lines) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 at scan rate of 50 mV/s before (dotted lines) and after (solid lines) 3 mM H_2O_2 additions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

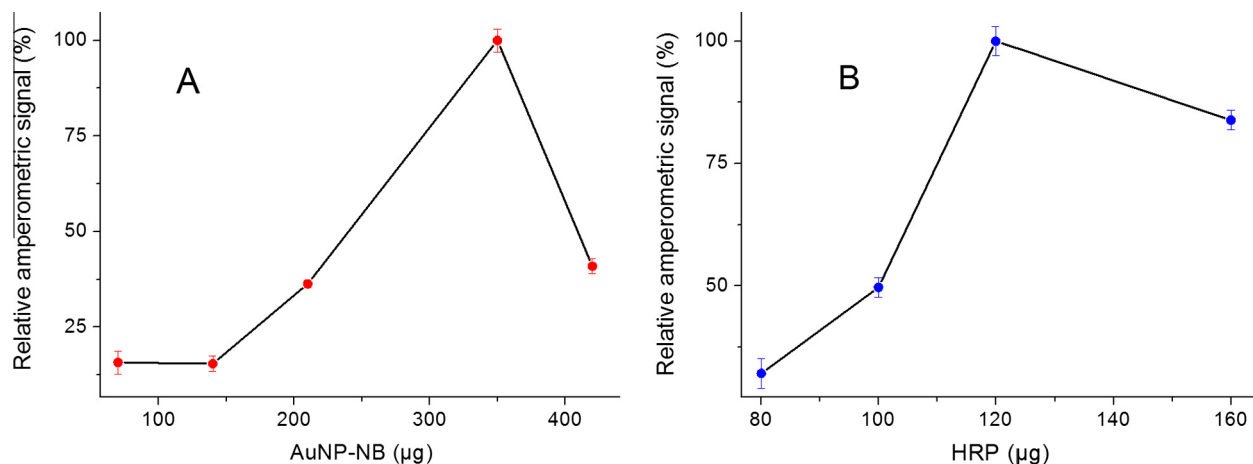


Fig. 5. Influence of the AuNP-NB (A) and HRP (B) loadings on the amperometric signal recorded with the HRP/AuNP-NB/GCE enzyme biosensors after addition of 10 μL of 1.0 μM H_2O_2 in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0. Working potential = -100 mV.

To construct an amperometric enzyme biosensor for the mediatorless detection of H_2O_2 , the parameters involved in the assembly of the HRP-based electrode were optimized by measuring the amperometric responses recorded at -100 mV toward additions

of 1 μM H_2O_2 . Fig. 5 shows as the measured current increased with the AuNP-NB hybrid nanomaterial loading up to 350 μg . High AuNP-NB loading caused a reduction in the analytical signal, which can be ascribed to low mechanical stability of the nanostructured film, thus leaking from the electrode surface. Moreover, covalent immobilization of 120 μg HRP provided also the larger amperometric responses and, therefore, the enzyme electrodes were assembled using these optimal conditions.

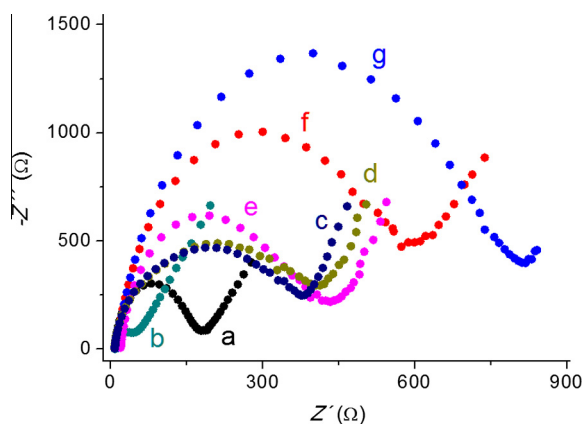


Fig. 6. Nyquist plots of bare GCE (a), AuNP/GCE (b), HRP/AuNP/GCE (c), NB/GCE (d), HRP/NB/GCE (e), AuNP-NB/GCE (f) and HRP/AuNP-NB/GCE (g) in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1).

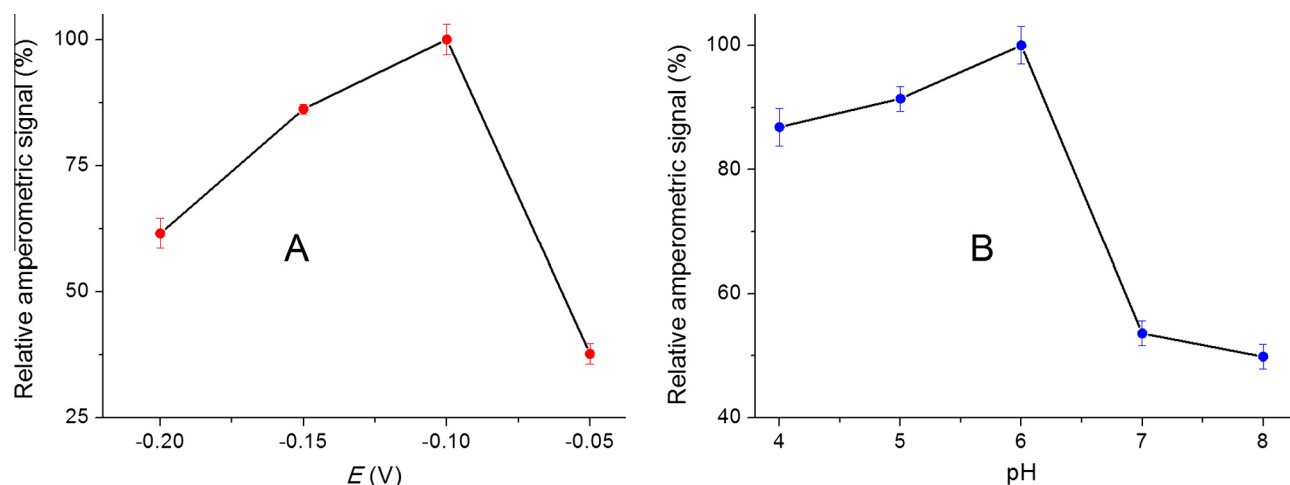


Fig. 7. Influence of working potential (A, pH 6.0) and pH (B, $E = -100$ mV) on the amperometric signal recorded with the HRP/AuNP-NB/GCE biosensor after addition of 10 μL of 1.0 μM H_2O_2 in 0.1 M sodium phosphate buffers.

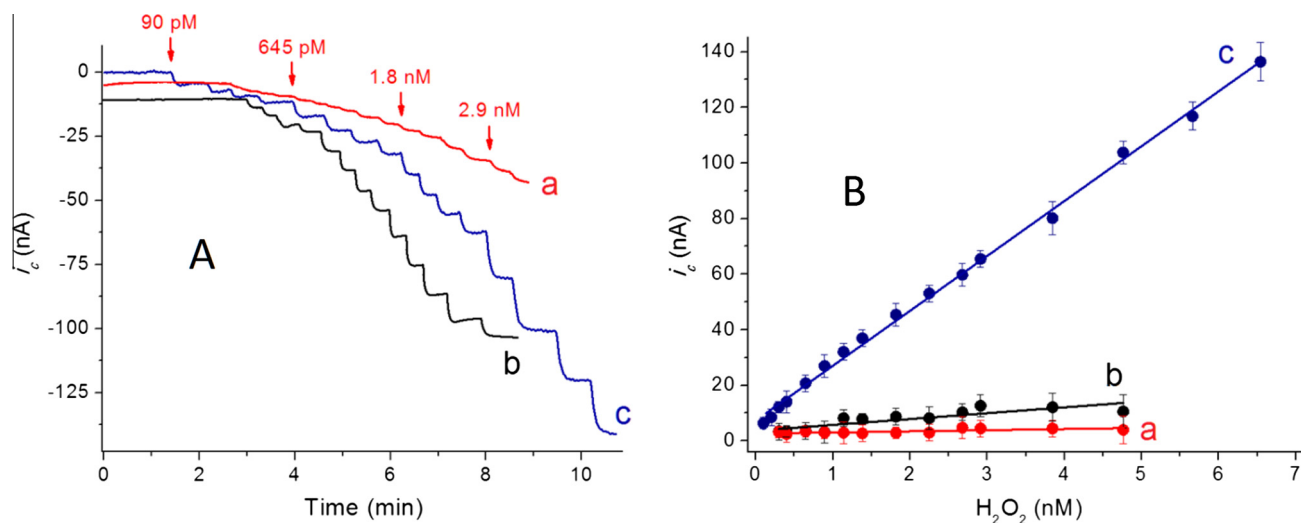


Fig. 8. Amperometric responses (A) and calibration curve (B) recorded with the HRP/NB/GCE (a), HRP/AuNP/GCE (b) and HRP/AuNP-NB/GCE (c) biosensors toward H_2O_2 . $E_{\text{app}} = -100$ mV, stirring condition: 300 rpm.

The nanostructured electrode was further employed to construct a mediatorless amperometric biosensor for H_2O_2 . Optimal working conditions for this biosensor were determined by evaluating the influence of the applied potential and pH on the amperometric response of the enzyme electrode towards addition of $1.0 \mu\text{M}$ H_2O_2 . As it can be seen in Fig. 7, higher currents were measured when the working potential was fixed at -100 mV versus Ag/AgCl and analytical determinations were performed in pH 6.0 solutions.

The amperometric responses obtained with the HRP/AuNP-NB/GCE electrode to successive additions of H_2O_2 are shown in Fig. 8A. As controls, HRP/AuNP/GCE and HRP/NB/GCE electrodes were also tested. The mediatorless biosensor exhibited a very fast response to H_2O_2 , reaching about 95% of the steady-state signals within 4 s. This amperometric biosensor was able to detect H_2O_2 at very low concentration, exhibiting a linear range of response ($r = 0.998$, $n = 10$) between 90 pM and 6.5 nM, according to the following equation:

$$i_c(A) = 17.7 \times c(\text{H}_2\text{O}_2/\text{M}) + 9 \cdot 10^{-9}$$

The biosensor showed a high sensitivity of 283 A/M cm^2 (17.7 A/M) and a very low detection limit of 45 pM at a signal-to-noise ratio of 3. It should be noticed that the control electrodes also showed electroanalytical response toward H_2O_2 . However, their analytical behaviour was lower in comparison with the

HRP/AuNP-NB/GCE based biosensor in term of linear range of response, sensitivity and limit of detection.

In comparison with other AuNP-based electrochemical biosensors previously described in literature, the HRP/AuNP-NB/GCE electrode showed best analytical characteristics in terms of linear range of response and limit of detection (Table 1). In addition,

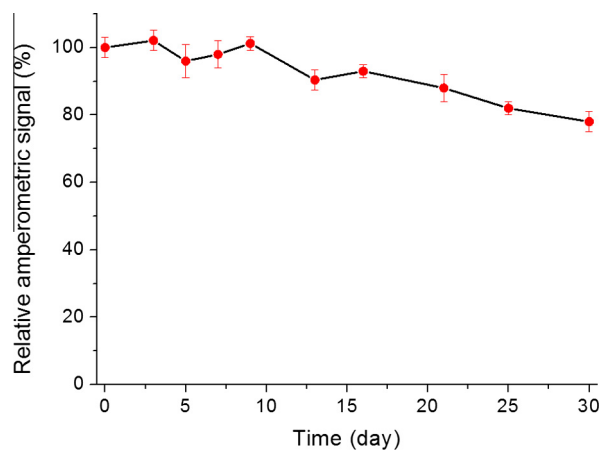


Fig. 9. Effect of time of storage at 4°C on the amperometric responses of the biosensor.

Table 1

Comparison of analytical properties of the biosensor with previously reported AuNP-based H_2O_2 biosensors.

Electrode	E (mV)	Linear range (mM)	Detection limit (μM)	Sensitivity (A/M cm^2)	Reference
HRP/polyAuNP/Au	0	$5 \cdot 10^{-3}$ –1.1	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$	[10]
HRP/pcAu	–50	$1 \cdot 10^{-7}$ – $4.0 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-8}$	1.4	[25]
HRP/C-Dots/LDHs/GCE	–350	$1 \cdot 10^{-4}$ – $2.3 \cdot 10^{-2}$	$0.04 \mu\text{M}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$	[27]
HRP/ZnO-AuNP-Naf/GCE	–300	0.015–1.1	$9 \cdot 10^{-6}$	–	[28]
HRP/AuNP/Gph/Chi/GCE	–300	$5 \cdot 10^{-3}$ –5.13	$1.7 \cdot 10^{-6}$	–	[29]
HRP/ CaCO_3 -AuNP/Au	–200	$5 \cdot 10^{-4}$ –5.2	$1 \cdot 10^{-7}$	–	[30]
HRP/AuNP-SF/GCE	–600	0.01–1.8	$5 \cdot 10^{-6}$	–	[31]
HRP-AuNP/ALG/Au	–400	0.02–13.7	$3 \cdot 10^{-6}$	$4.0 \cdot 10^{-2}$	[32]
HRP/AuNP/ITO	–150	$8 \cdot 10^{-3}$ –3.0	$2 \cdot 10^{-6}$	–	[33]
HRP/AuNP-NB/GCE	–100	$9 \cdot 10^{-8}$ – $6.5 \cdot 10^{-6}$	$4.5 \cdot 10^{-11}$	283	This work

AuNP: Gold nanoparticles; Naf: Nafion; Gph: graphene; Chi: chitosan; SF: silk fibroin; ALG: sodium alginate; ITO: indium tin oxide electrode, pcAu: polycrystalline Au electrode; C-Dots: carbon nanodots; LDHs: CoFe layered double hydroxides.

the biosensor showed higher sensitivity than those based on recombinant HRP adsorbed on polycrystalline gold (1.4 A/M cm^2) [25], HRP immobilized on electropolymerized gold nanoparticles ($498 \text{ } \mu\text{A/M cm}^2$) [10], HRP attached to ferrocene-modified chitosan (28.4 nA/M) [26] and HRP immobilized on carbon nanodots/CoFe layered double hydroxides (55 mA/M cm^2) [27].

The reproducibility of the enzyme biosensor was estimated by measuring the response of five different electrodes to $1 \text{ nM H}_2\text{O}_2$, and the relative standard deviation for these measurements was calculated as 7.4%. In addition, a relative standard deviation of 4.9% was calculated when the same electrode was used to measure repeatedly ten different $100 \text{ pM H}_2\text{O}_2$ additions.

Fig. 9 shows the effect of time of storage at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ under dry conditions on the amperometric response of the biosensor toward $2 \text{ nM H}_2\text{O}_2$. The reagentless biosensor exhibited good storage stability, retaining 96% and 78% of its initial activity after 15 and 30 days of storage at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. On the other hand, the biosensor showed excellent selectivity toward H_2O_2 , with no significant changes in the amperometric response toward $2 \text{ nM H}_2\text{O}_2$ in the presence of l-glucose , ethanol, acetic acid, sucrose, lactic acid, uric acid and citric acid at $1 \text{ } \mu\text{M}$ concentration. Under these conditions, the biosensor only showed a little change of about 7% in the amperometric response after addition of $1 \text{ } \mu\text{M}$ ascorbic acid.

4. Conclusions

A novel hybrid nanomaterial based on silver:bipyridine nanobelts decorated with bi-functionalized AuNP was prepared. In contrast to previously reported non-doped nanomaterial [22], this nanohybrid showed interesting fern-like fractal morphology. The electrocatalytic activity toward H_2O_2 was also noticeably improved, and accordingly, this new nanohybrid was employed to construct a mediatorless enzyme biosensor able to detect the analyte at picomolar levels. The biosensor exhibited a superior analytical performance than other previously described [25–33], in terms of sensitivity, selectivity, stability, fast electroanalytical response and limit of detection. According to our results, it can be predicted that this nanohybrid could be employed as electroactive transduction element for the assembly of other advanced amperometric enzyme biosensors.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness CTQ2014-58989-P, CTQ2015-71936-REDT, CTQ2015-64402-C2-1-R and Comunidad de Madrid S2013/MIT-3029, Programme NANOAVANSENS is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.07.074>.

References

- [1] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763.
- [2] K. Kerman, M. Saito, E. Tamiya, S. Yamamura, Y. Takamura, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 585–592.
- [3] M. Zhang, W. Gorski, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3960–3965.
- [4] A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 441–456.
- [5] S. Bharathi, M. Nogami, S. Ikeda, *Langmuir* 17 (2001) 1–4.
- [6] R. Villalonga, P. Díez, M. Eguílaz, P. Martínez, J.M. Pingarrón, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 4312–4319.
- [7] N. German, A. Kausaite-Minkstiene, A. Ramanavicius, T. Semashko, R. Mikhailova, A. Ramanaviciene, *Electrochim. Acta* 169 (2015) 326–333.
- [8] H. Ekram, A. Galal, N.F. Atta, *J. Electroanal. Chem.* 749 (2015) 42–52.
- [9] Y. Yang, A.M. Asiri, D. Du, Y. Lin, *Analyst* 139 (2014) 3055–3060.
- [10] R. Villalonga, P. Díez, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 4672–4677.
- [11] X. Cai, X. Gao, L. Wang, Q. Wu, X. Lin, *Sens. Actuator B Chem.* 181 (2013) 575–583.
- [12] X. Liu, J. Zhang, S. Liu, Q. Zhang, X. Liu, D.K. Wong, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4350–4356.
- [13] M. Eguílaz, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, N.F. Ferreyra, G.A. Rivas, *Sens. Actuator B Chem.* 216 (2015) 629–637.
- [14] S. Azzouzi, L. Rotariu, A.M. Benito, W.K. Maser, M.B. Ali, C. Bala, *Biosens. Bioelectron.* 69 (2015) 280–286.
- [15] S. Abraham, N.R. Nirala, S. Pandey, M. Srivastava, S. Srivastava, B. Walkenfort, A. Srivastava, *Anal. Met.* 7 (2015) 3993–4002.
- [16] Z.M. Liu, Y. Yang, H. Wang, Y.L. Liu, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Sens. Actuator B Chem.* 106 (2005) 394–400.
- [17] Y. Zhao, X. Fang, X. Yan, X. Zhang, Z. Kang, G. Zhang, Y. Zhang, *Microchim. Acta* 182 (2015) 605–610.
- [18] A. Boujakhrou, E. Sánchez, P. Díez, A. Sánchez, P. Martínez-Ruiz, C. Parrado, J.M. Pingarrón, R. Villalonga, *ChemElectroChem* 2 (2015) 1735–1741.
- [19] R. Villalonga, R. Cao, J. Hernández, C. Camacho, *Chem. Commun.* (2007) 942–944.
- [20] H.G. Liao, Y.X. Jiang, Z.Y. Zhou, S.P. Chen, S.G. Sun, *Angew. Chem.* 120 (2008) 9240–9243.
- [21] M.C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346.
- [22] Y. Luo, W. Lu, G. Chang, F. Liao, X. Sun, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 8371–8374.
- [23] C. Camacho, J.C. Matías, B. Chico, R. Cao, L. Gómez, B.K. Simpson, R. Villalonga, *Electroanalysis* 19 (2007) 2538–2542.
- [24] J. Liu, W. Ong, E. Román, M.J. Lynn, A.E. Kaifer, *Langmuir* 16 (2000) 3000–3002.
- [25] E.E. Ferapontova, V.G. Grigorenko, A.M. Egorov, T. Börchers, T. Ruzgas, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 147–157.
- [26] A. Garcia, C. Peniche-Covas, B. Chico, B.K. Simpson, R. Villalonga, *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 435–439.
- [27] Y. Wang, Z. Wang, Y. Rui, M. Li, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 57–62.
- [28] C. Xiang, Y. Zou, L.X. Sun, F. Xu, *Sens. Actuator B Chem.* 136 (2009) 158–162.
- [29] K.F. Zhou, Y.H. Zhu, X.L. Yang, J. Luo, C.Z. Li, S.R. Luan, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 3055–3060.
- [30] F. Li, Y. Feng, Z. Wang, L.M. Yang, L.H. Zhuo, B. Tang, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2244–2248.
- [31] H. Yin, S. Ai, W. Shi, L. Zhu, *Sens. Actuator B Chem.* 137 (2009) 747–753.
- [32] B. Chico, C. Camacho, M. Pérez, M.A. Longo, M.A. Sanromán, J.M. Pingarrón, R. Villalonga, *J. Electroanal. Chem.* 629 (2009) 126–132.
- [33] J. Wang, L. Wang, J. Di, Y. Tu, *Talanta* 77 (2009) 1454–1459.

SUPPORTING INFORMATION

GOLD NANOPARTICLES-DECORATED SILVER-BIPYRIDINE NANOBELTS FOR THE CONSTRUCTION OF MEDIATORLESS HYDROGEN PEROXIDE BIOSENSOR

*Abderrahmane Boujakhrou,^a Paula Díez,^{*a} Alfredo Sánchez,^a Paloma Martínez-Ruíz,^b
José M. Pingarrón,^a Reynaldo Villalonga^{*a}*

^aDepartment of Analytical Chemistry and ^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid Spain.

*Corresponding authors. Phone: +34 91 3944315, Fax: +34 91 3944329,
E-mail: paula.diez@ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es

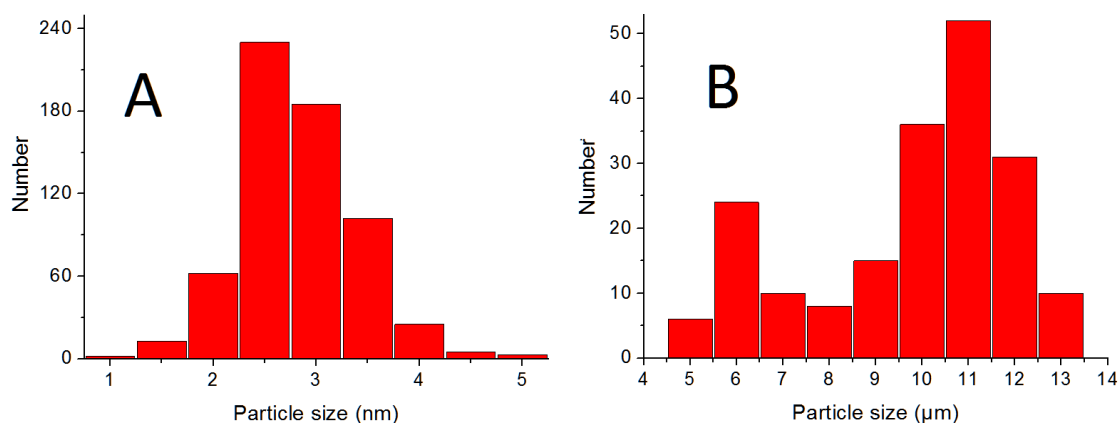


Figure 1S. Size distribution for bi-functionalized Au nanoparticles (A) and AuNP-decorated nanobelts (B).

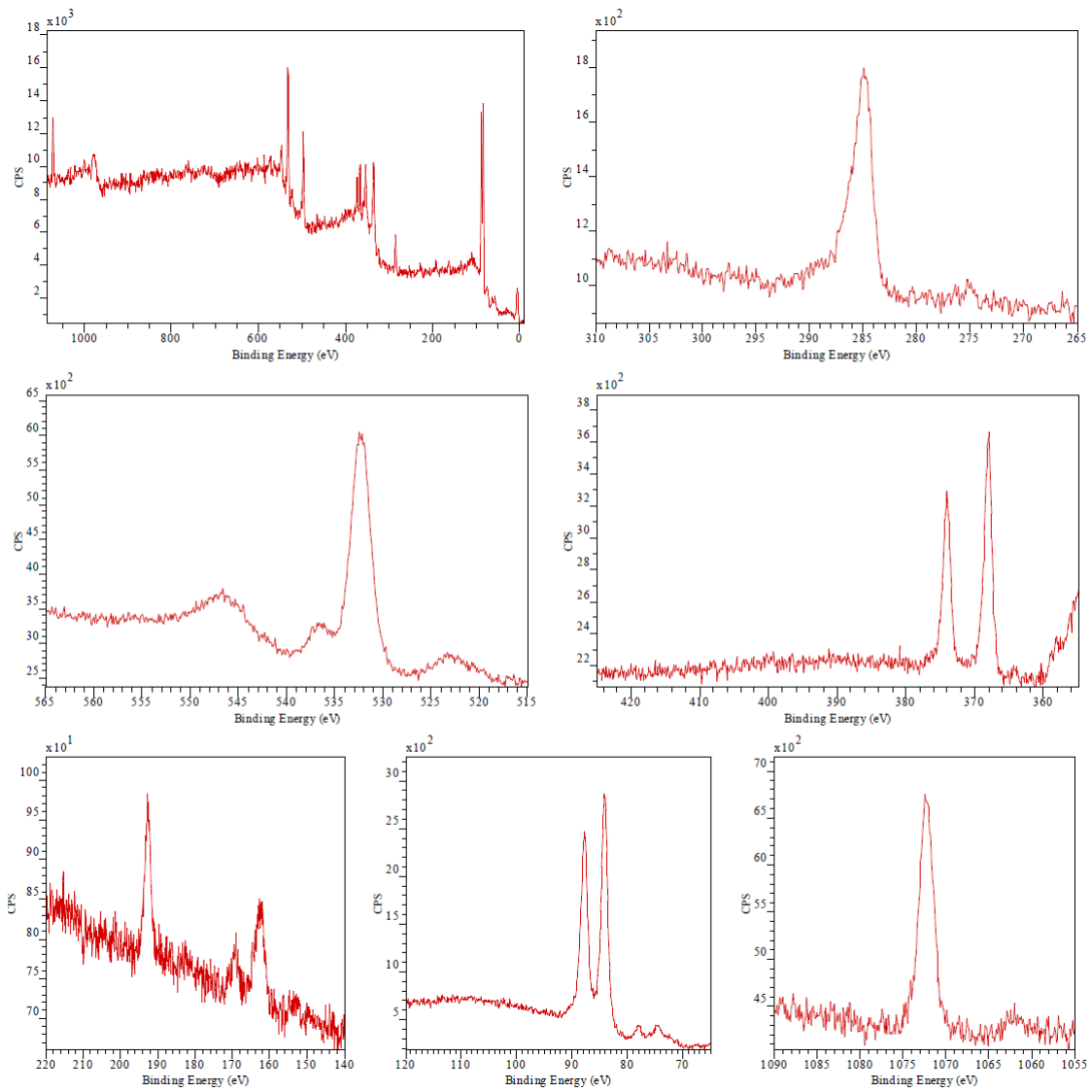


Figure 2S. XPS analysis of AuNPs.

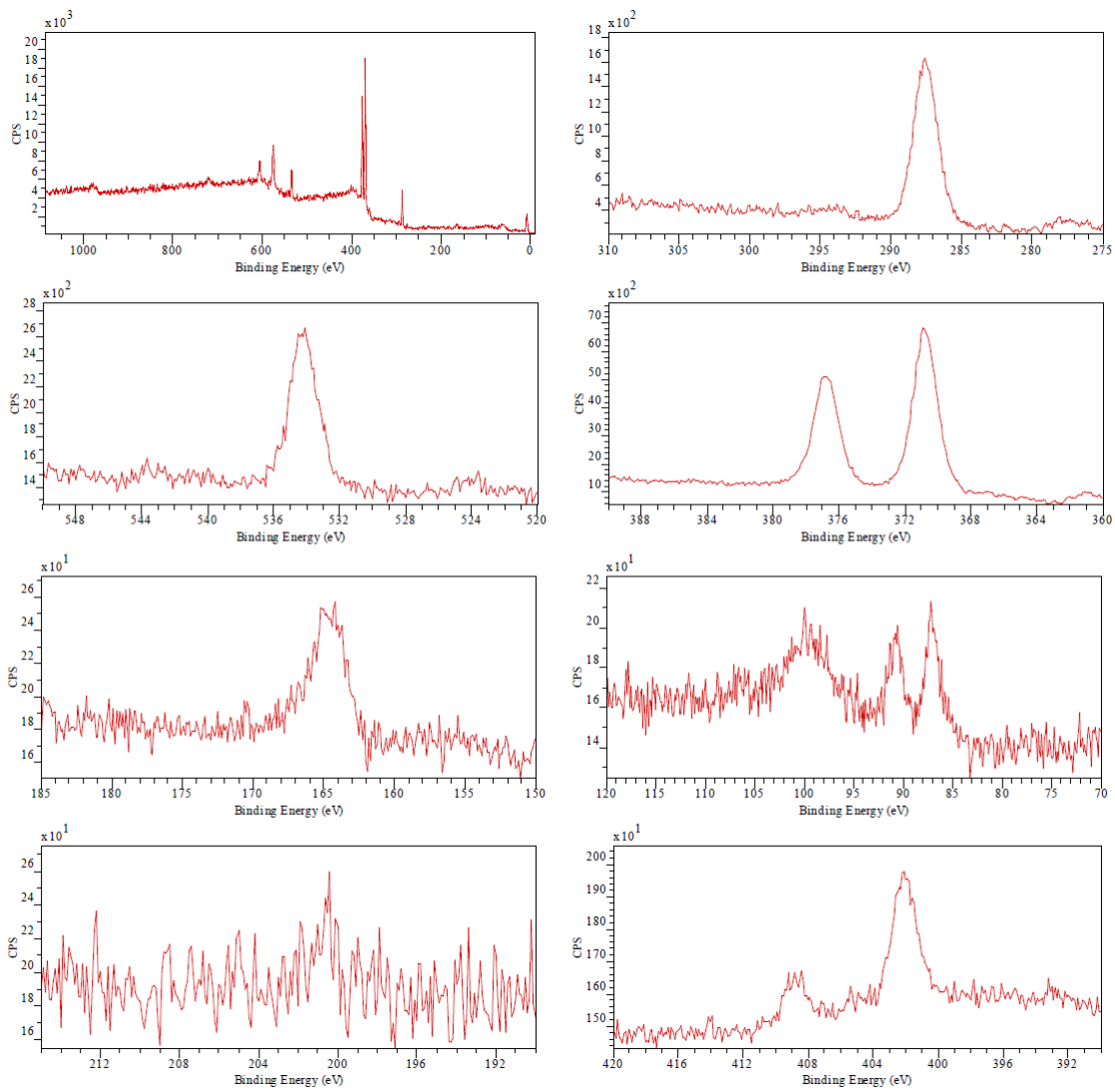


Figure 4S. XPS analysis of AuNP-NB.

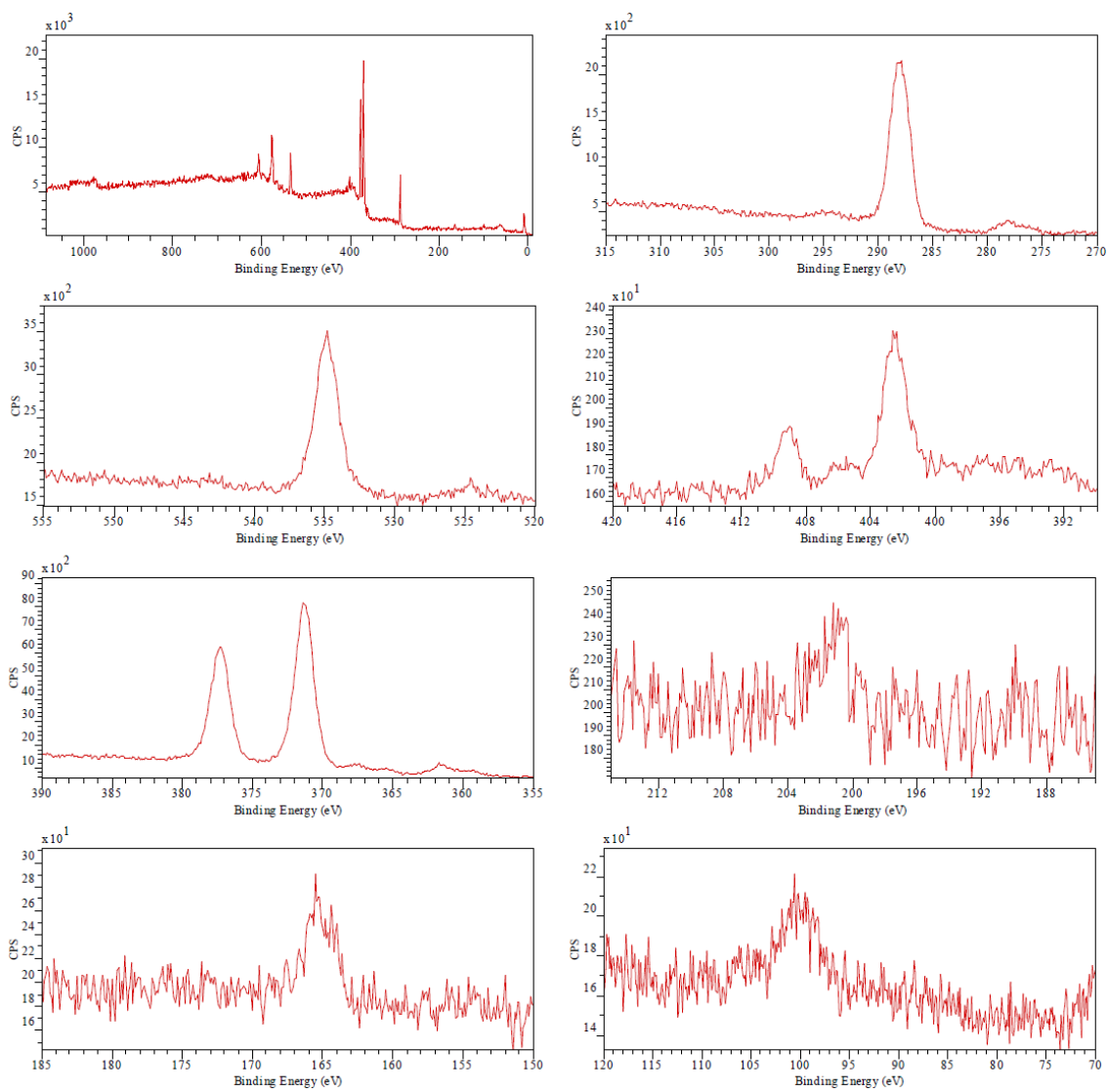


Figure 3S. XPS analysis of silver:bipyridine nanobelts.

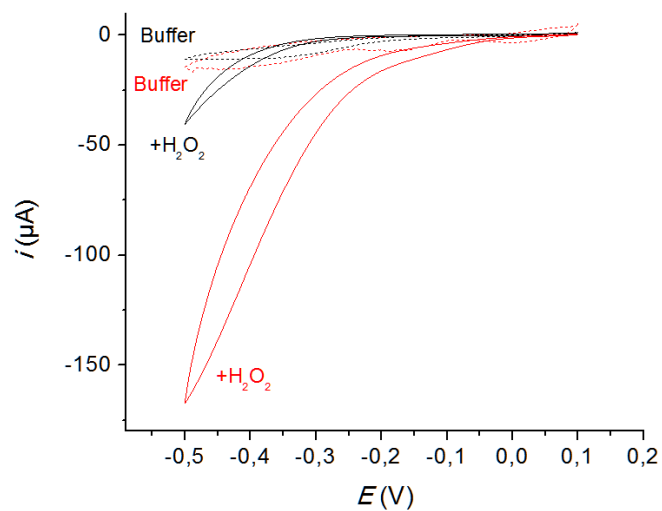


Figure 5S. Cyclic voltammograms recorded at the AuNP/GCE (black lines) and HRP/AuNP/GCE (red lines) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 at scan rate of 50 mV/s before (dotted lines) and after (solid lines) 3 nM H₂O₂ additions.



click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 74957

Received 18th May 2016
Accepted 2nd August 2016

DOI: 10.1039/c6ra12972b

www.rsc.org/advances

Gold nanoparticles/silver-bipyridine hybrid nanobelts with tuned peroxidase-like activity†

Abderrahmane Boujakhrou, ^a Paula Díez, ^a Paloma Martínez-Ruiz, ^b Alfredo Sánchez, ^{*a} Concepción Parrado, ^a Eloy Povedano, ^a Paul Soto, ^a José M. Pingarrón ^{*a} and Reynaldo Villalonga ^{*a}

Gold nanoparticles-decorated silver-bipyridine coordination polymers with intrinsic peroxidase-like activity are reported. Both morphology and mimetic enzyme activity can be tuned by rational manipulation of the nanohybrid composition. The nanomaterial was used for the electrochemical determination of H₂O₂ and glucose.

Enzymes are protein catalysts involved in almost all chemical reactions occurring in living organisms. For decades, enzymes have been largely employed as catalysts in chemical, biotechnological, agricultural, food, and pharmaceutical industries due to their high catalytic efficiency and unique substrate stereo-, regio-, and chemoselectivity.¹ In addition, enzymes have been demonstrated to be valuable for analytical tools, therapeutic agents, cosmetics and laundry active components.²

However, practical application of enzymes is often limited by their intrinsic low stability, which is mainly caused by the complex 3D polypeptide active structure. For this reason, a great variety of strategies for enzyme stabilization have been developed, mainly based on immobilization on macro- and nano-sized supports or covalent modification with water-soluble compounds.³ In addition, many efforts have been devoted to the rational preparation of chemical and nanomaterials-based derivatives with enzyme mimetic activity.⁴

This communication describes for the first time the preparation of Au nanoparticles (AuNP)-decorated silver-bipyridine hybrid nanomaterials exhibiting remarkable peroxidase-like mimetic activity. These noble metal-based nanomaterials have been selected as building blocks for the assembly of the mimetic enzyme due to the large and attractive use of Au and Ag

nanostructures in such as biosensing and biomedical applications.⁵

The rationale of this synthetic strategy is illustrated in Fig. 1. AuNPs polyfunctionalized with pyridine and hydroxyl residues were prepared by reducing HAuCl₄ with NaBH₄ in a DMSO solution containing 6-mercapto-1-hexanol and 4-mercaptopyridine in a 3 : 1 molar ratio (see ESI†).⁶ These two thiol-derivatives were selected as capping ligands for the nanoparticles to confer the resulting nanomaterial with the desired characteristics. In fact, 6-mercapto-1-hexanol should provide solubility and colloidal stability to the nanoparticles in aqueous solutions, while 4-mercaptopyridine should confer coordination ability with Ag⁺ ions allowing formation of stable linkages when included into the silver-bipyridine coordination polymer.

Water soluble dark red nanoparticles were obtained by this method. HR-TEM analysis revealed a spherical geometry with an average diameter of 2.6 ± 0.7 nm for the polyfunctionalized nanoparticles (see Fig. 1S in ESI†). This size and size dispersion was similar to those reported for other polyfunctionalized Au nanoparticles prepared by using the same procedure.^{6,7} In addition, the presence of the capping ligands on the nanoparticles surface was confirmed by FT-IR (Fig. 2S in ESI†).

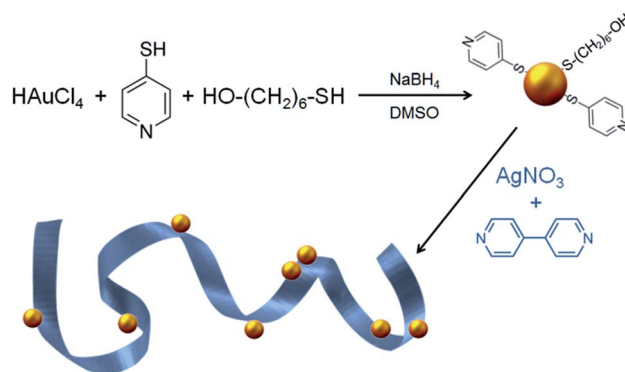


Fig. 1 Schematic display of synthesis of pyridine-coated AuNP/Ag-bipyridine nanobelts.

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: alfredosanchez@quim.ucm.es; pingarro@quim.ucm.es; rvillalonga@quim.ucm.es; Tel: +34 913944315

^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Preparation and characterization of nanomaterials and electrochemical sensor devices. See DOI: 10.1039/c6ra12972b

Supplementary Information

Gold nanoparticles/silver-bipyridine hybrid nanobelts with tuned peroxidase-like activity

Abderrahmane Boujakhrou,^a Paula Díez,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Alfredo Sánchez,^{*a,c} Concepción Parrado,^a Eloy Povedano,^a Paul Soto,^a José M. Pingarrón,^{*a,c} Reynaldo Villalonga^{*a,c}

^a *Departments of Analytical Chemistry and ^bOrganic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. Tel: +34 913944315; E-mail: alfredosanchez@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es; rvillalonga@quim.ucm.es*
^c *IMDEA Nanoscience, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain*

Reagents and apparatus

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Transmission electron microscopy (TEM) and high resolution field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) were performed with JEOL JEM 2100 and JEOL JSM-6335F microscopes, respectively. Amperometric measurements were performed with an Inbea potentiostat. Cyclic voltammetry (CV) were performed using a FRA2 μ Autolab Type III potentiostat/galvanostat. A conventional three-electrode system was employed in the electrochemical studies, where the working electrode was a glassy carbon electrode (GCE, 3.0 mm diameter) modified with glucose oxidase and/or the AuNP-decorated hybrid material. An Ag/AgCl/KCl (3 M) and a Pt wire were used as reference and counter electrodes, respectively. The measurements with the biosensor were carried out at 25°C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (working volume 10 ml).

Synthesis of the polyfunctionalized AuNP¹

HAuCl₄ (50 mg) was dissolved in 12.7 mL of de-aerated DMSO. This solution was added dropwise to 12.7 mL of de-aerated DMSO containing 60 mg sodium borohydride, 10 mg 4-

mercaptopyridine and 36.2 mg 6-mercapto-1-hexanol under vigorous stirring. The reaction mixture turned deep brown immediately, but the reaction was continued for 24 h. The functionalized AuNPs were then precipitated by adding 25 mL CH₃CN, collected by centrifugation, and washed with 50 mL CH₃CN:DMSO (1:1 v/v), 50 mL ethanol and 10 mL diethyl ether. The nanoparticles were finally isolated by centrifugation and dried under N₂. The polyfunctionalized AuNP were characterized by TEM and FT-IR.

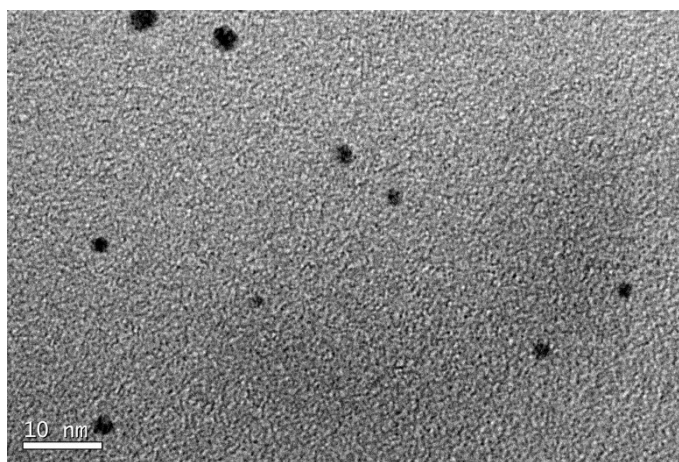


Fig. 1S TEM image of polyfunctionalized AuNP.

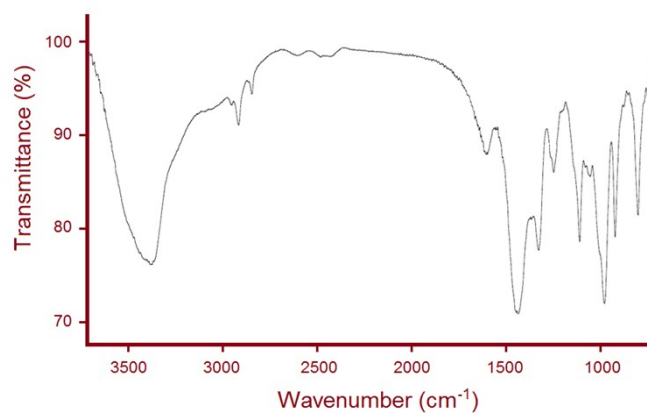


Fig. 2S FT-IR of polyfunctionalized Au nanoparticles.

FT-IR analysis revealed the presence of 4-mercaptopyridine moieties on the Au nanoparticles surface by the peaks at 16255 cm^{-1} , 14554 cm^{-1} and 13478 cm^{-1} , which can be ascribed to the symmetric wag-stretch, symmetric C-H wag and C-H wag in the aromatic pyridine ring, respectively. On the other hand, 6-mercapto-1-hexanol residues were identified by the broad peak at 3380 cm^{-1} corresponding to the stretching of the O-H groups, as well as by the peaks at 29212 cm^{-1} and 1003 cm^{-1} , which can be ascribed to the stretching of the C-H and C-O groups, respectively.

Preparation of the AuNP-decorated hybrid nanomaterial

The AuNP-decorated nanohybrids were prepared by modification of the method reported by Luo *et al.* for silver:bipyridine nanobelts.² Aqueous solutions of AuNP (10 mg/mL) and AgNO_3 (34 mg/mL), and ethanolic solution of 4,4'-bipyridine (16 mg/mL) were freshly prepared. Nanohybrids with different content of AuNP were prepared by mixing different volumes of AuNP stock solution (0, 50, 100, 150, 200 and 300 μL) with 1 mL AgNO_3 and 2 mL 4,4'-bipyridine stock solutions under gentle continuous stirring at room temperature. After 10 min, the resulting precipitate was centrifuged, repeatedly washed with double distilled water and ethanol and finally dispersed in ethanol up to 14 mg/mL final concentration.

The Au/Ag molar ratio in these hybrid nanomaterials was determined by X-ray fluorescence spectroscopy, and the results are shown in Table 1S.

Table 1S Au/Ag ratio in the hybrid nanomaterials

Sample	Au/Ag (mol/mol)
AuNP/AgNO ₃ -0	-
AuNP/AgNO ₃ -50	0.043
AuNP/AgNO ₃ -100	0.093
AuNP/AgNO ₃ -150	0.151
AuNP/AgNO ₃ -200	0.188
AuNP/AgNO ₃ -300	0.287

Enzymatic assay

The peroxidase-like activity of the nanomaterials was evaluated by recording the changes in $A_{405\text{nm}}$ at 25°C in 40 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, using 9 mM ABTS and 3 mM H₂O₂ as substrates, according to the protocol previously reported by Jiang & Penner for peroxidase enzyme.³

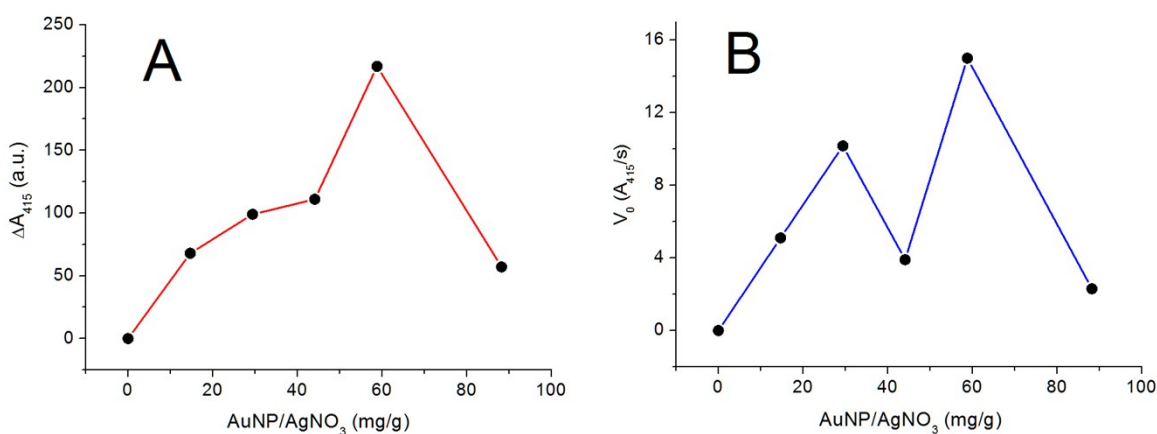


Fig. 3S Effect of AuNP-decorated nanohybrid composition on the maximum increase of absorbance at 405 nm (A) and initial velocity (B).

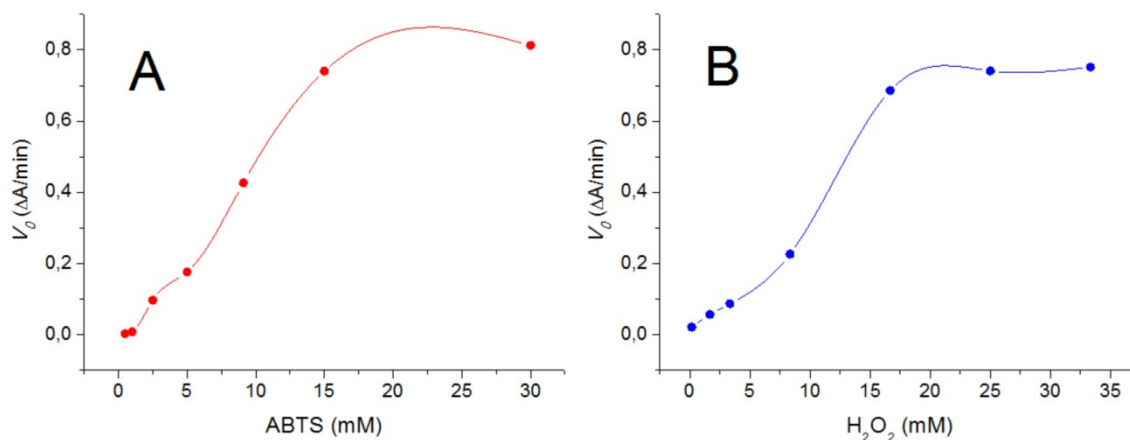


Fig. 4S Effect of ABTS (A) and H_2O_2 (B) concentration on the initial rate for the nano-hybrid-catalyzed reaction. Fixed H_2O_2 concentration in (A) = 3 mM; fixed ABTS concentration in (B) = 9 mM.

Preparation of the electrodes

To construct the amperometric sensor for H_2O_2 , a polished GCE was coated with 20 μL of the ethanolic dispersion of the nano-hybrid and allowing drying. To construct the enzyme biosensor for glucose, glucose oxidase was further immobilized on the nanostructured electrode by dropping 10 μL of a 10 mg/mL enzyme solution in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and mixed with 2 μL of 25% (v/v) glutaraldehyde. The electrode was kept at 4°C for 1 h, then washed several times with cold 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, dried and finally stored in refrigerator until use.

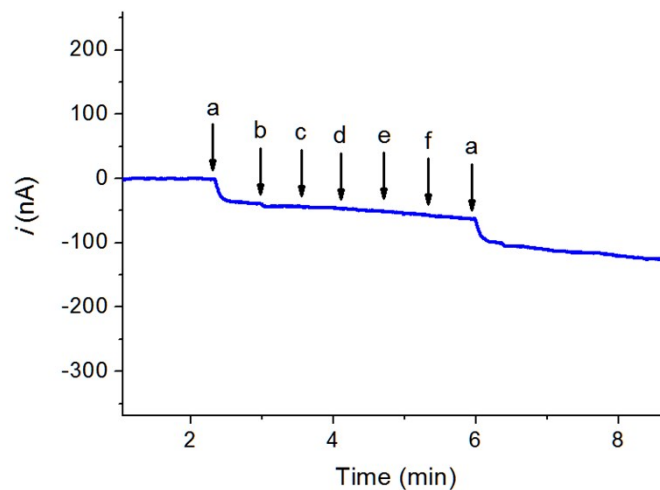


Fig. 5S Amperometric response of the the glassy carbon electrode coated with the AuNP-decorated nanohybrid toward H_2O_2 (a), ascorbic acid (b), uric acid (c), glucose (d), L-tyrosine (e) and sucrose (f) at 100 μM final concentration. $E_{\text{app}} = -100$ mV, stirring condition: 300 rpm.

References

- [1] R. Villalonga, P. Diez, M. Eguílaz, P. Martínez, J.M. Pingarrón, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2012, **4**, 4312.
- [2] Y. Luo, W. Lu, G. Chang, F. Liao, X. Sun, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 8371.
- [3] S. Jiang, M.H. Penner, *Anal. Biochem.*, 2015, **476**, 20.

Supplementary Information

Gold nanoparticles/silver-bipyridine hybrid nanobelts with tuned peroxidase-like activity

Abderrahmane Boujakhrou,^a Paula Díez,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Alfredo Sánchez,^{*a,c} Concepción Parrado,^a Eloy Povedano,^a Paul Soto,^a José M. Pingarrón,^{*a,c} Reynaldo Villalonga^{*a,c}

^a *Departments of Analytical Chemistry and ^bOrganic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. Tel: +34 913944315; E-mail: alfredosanchez@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es; rvillalonga@quim.ucm.es*
^c *IMDEA Nanoscience, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain*

Reagents and apparatus

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Transmission electron microscopy (TEM) and high resolution field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) were performed with JEOL JEM 2100 and JEOL JSM-6335F microscopes, respectively. Amperometric measurements were performed with an Inbea potentiostat. Cyclic voltammetry (CV) were performed using a FRA2 μ Autolab Type III potentiostat/galvanostat. A conventional three-electrode system was employed in the electrochemical studies, where the working electrode was a glassy carbon electrode (GCE, 3.0 mm diameter) modified with glucose oxidase and/or the AuNP-decorated hybrid material. An Ag/AgCl/KCl (3 M) and a Pt wire were used as reference and counter electrodes, respectively. The measurements with the biosensor were carried out at 25°C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (working volume 10 ml).

Synthesis of the polyfunctionalized AuNP¹

HAuCl₄ (50 mg) was dissolved in 12.7 mL of de-aerated DMSO. This solution was added dropwise to 12.7 mL of de-aerated DMSO containing 60 mg sodium borohydride, 10 mg 4-

mercaptopyridine and 36.2 mg 6-mercapto-1-hexanol under vigorous stirring. The reaction mixture turned deep brown immediately, but the reaction was continued for 24 h. The functionalized AuNPs were then precipitated by adding 25 mL CH₃CN, collected by centrifugation, and washed with 50 mL CH₃CN:DMSO (1:1 v/v), 50 mL ethanol and 10 mL diethyl ether. The nanoparticles were finally isolated by centrifugation and dried under N₂. The polyfunctionalized AuNP were characterized by TEM and FT-IR.

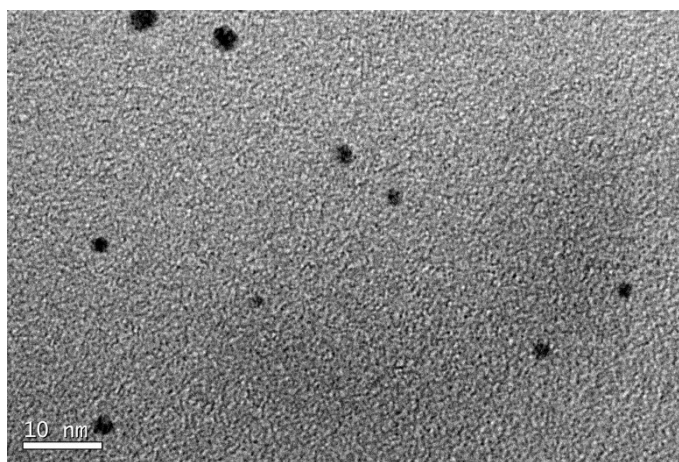


Fig. 1S TEM image of polyfunctionalized AuNP.

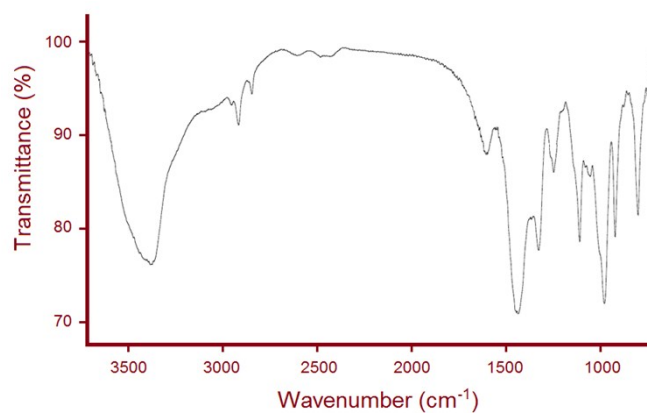


Fig. 2S FT-IR of polyfunctionalized Au nanoparticles.

FT-IR analysis revealed the presence of 4-mercaptopyridine moieties on the Au nanoparticles surface by the peaks at 16255 cm^{-1} , 14554 cm^{-1} and 13478 cm^{-1} , which can be ascribed to the symmetric wag-stretch, symmetric C-H wag and C-H wag in the aromatic pyridine ring, respectively. On the other hand, 6-mercapto-1-hexanol residues were identified by the broad peak at 3380 cm^{-1} corresponding to the stretching of the O-H groups, as well as by the peaks at 29212 cm^{-1} and 1003 cm^{-1} , which can be ascribed to the stretching of the C-H and C-O groups, respectively.

Preparation of the AuNP-decorated hybrid nanomaterial

The AuNP-decorated nanohybrids were prepared by modification of the method reported by Luo *et al.* for silver:bipyridine nanobelts.² Aqueous solutions of AuNP (10 mg/mL) and AgNO_3 (34 mg/mL), and ethanolic solution of 4,4'-bipyridine (16 mg/mL) were freshly prepared. Nanohybrids with different content of AuNP were prepared by mixing different volumes of AuNP stock solution (0, 50, 100, 150, 200 and 300 μL) with 1 mL AgNO_3 and 2 mL 4,4'-bipyridine stock solutions under gentle continuous stirring at room temperature. After 10 min, the resulting precipitate was centrifuged, repeatedly washed with double distilled water and ethanol and finally dispersed in ethanol up to 14 mg/mL final concentration.

The Au/Ag molar ratio in these hybrid nanomaterials was determined by X-ray fluorescence spectroscopy, and the results are shown in Table 1S.

Table 1S Au/Ag ratio in the hybrid nanomaterials

Sample	Au/Ag (mol/mol)
AuNP/AgNO ₃ -0	-
AuNP/AgNO ₃ -50	0.043
AuNP/AgNO ₃ -100	0.093
AuNP/AgNO ₃ -150	0.151
AuNP/AgNO ₃ -200	0.188
AuNP/AgNO ₃ -300	0.287

Enzymatic assay

The peroxidase-like activity of the nanomaterials was evaluated by recording the changes in $A_{405\text{nm}}$ at 25°C in 40 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, using 9 mM ABTS and 3 mM H₂O₂ as substrates, according to the protocol previously reported by Jiang & Penner for peroxidase enzyme.³

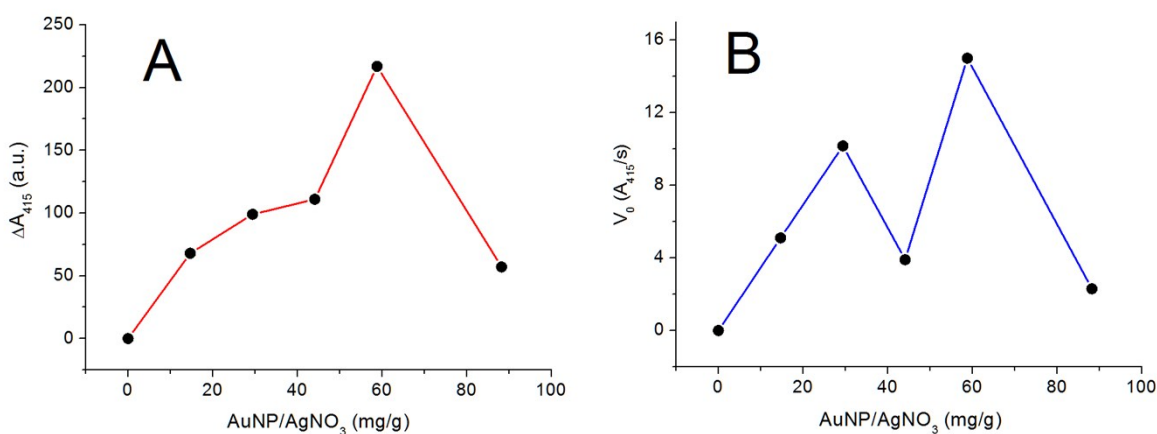


Fig. 3S Effect of AuNP-decorated nanohybrid composition on the maximum increase of absorbance at 405 nm (A) and initial velocity (B).

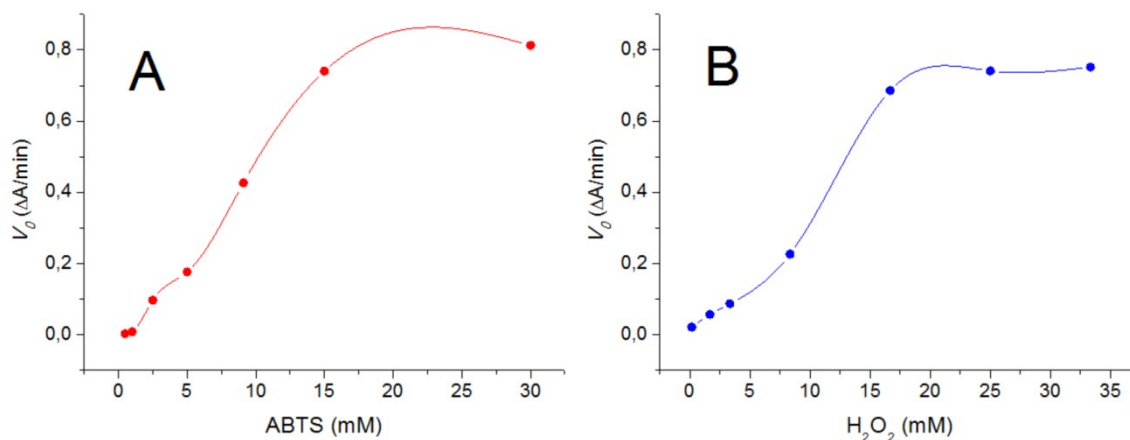


Fig. 4S Effect of ABTS (A) and H_2O_2 (B) concentration on the initial rate for the nano-hybrid-catalyzed reaction. Fixed H_2O_2 concentration in (A) = 3 mM; fixed ABTS concentration in (B) = 9 mM.

Preparation of the electrodes

To construct the amperometric sensor for H_2O_2 , a polished GCE was coated with 20 μL of the ethanolic dispersion of the nano-hybrid and allowing drying. To construct the enzyme biosensor for glucose, glucose oxidase was further immobilized on the nanostructured electrode by dropping 10 μL of a 10 mg/mL enzyme solution in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and mixed with 2 μL of 25% (v/v) glutaraldehyde. The electrode was kept at 4°C for 1 h, then washed several times with cold 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, dried and finally stored in refrigerator until use.

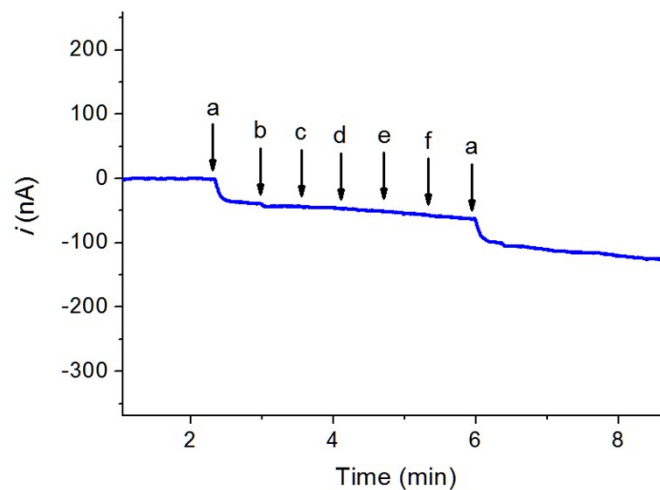


Fig. 5S Amperometric response of the the glassy carbon electrode coated with the AuNP-decorated nanohybrid toward H_2O_2 (a), ascorbic acid (b), uric acid (c), glucose (d), L-tyrosine (e) and sucrose (f) at 100 μM final concentration. $E_{\text{app}} = -100$ mV, stirring condition: 300 rpm.

References

- [1] R. Villalonga, P. Diez, M. Eguílaz, P. Martínez, J.M. Pingarrón, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2012, **4**, 4312.
- [2] Y. Luo, W. Lu, G. Chang, F. Liao, X. Sun, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 8371.
- [3] S. Jiang, M.H. Penner, *Anal. Biochem.*, 2015, **476**, 20.