

Síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados aplicados al diseño de sensores y biosensores electroquímicos

TESIS DOCTORAL

Cecilia Soledad Tettamanti

Departamento de Físicoquímica. Facultad de Ciencias
Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

INFIQC-CONICET

CÓRDOBA - ARGENTINA

2019



I N F I Q C

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT.....	IX
PALABRAS CLAVE	XI
KEYWORDS.....	XI
PUBLICACIONES	XIII
ABREVIATURAS	XV

Capítulo 1: Introducción general

1.1. Sensores y biosensores	3
1.1.1. Clasificación según el tipo de transductor	5
1.1.2. Clasificación por la capa de biorreconocimiento	7
1.2. Enzimas	9
1.3. Aptámeros.....	12
1.4. Inmovilización de biomoléculas.....	15
1.5. Nanomateriales.....	18
1.5. Bibliografía	20

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Técnicas electroquímicas	33
2.1.1. Voltamperometría cíclica	34
2.1.1-A. Respuesta de especies en solución.....	34
2.1.2-B. Respuesta de especies adsorbidas.....	38

2.1.2. Amperometría	39
2.1.3. Voltamperometría hidrodinámica	41
2.1.4. Espectroscopia de impedancia electroquímica	42
2.1.4-A. Circuitos eléctricos equivalentes	44
2.1.2. Equipamiento electroquímico	47
2.2. Microscopías	48
2.2.1. Microscopía electrónica de barrido	48
2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	49
2.3. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis).....	50
2.3. Difracción de rayos X	52
2.4. Celdas electroquímicas y electrodos	53
2.4.1. Electrodos compuesto de pasta de grafito	54
2.4.2. Electrodos de oro	56
2.4.2-A. Limpieza y pretratamiento de electrodos de oro.....	57
2.5. Bibliografía	59

Capítulo 3: Biosensor amperométrico para la cuantificación de glucosa basado en el uso de nanopartículas de magnetita

3.1. Introducción.....	65
3.1.1. Nanopartículas magnéticas	65
3.1.2. Biosensores para glucosa	67
3.2. Metodología experimental	68
3.2.1. Síntesis de mNPs@C.....	69
3.2.2. Preparación de los electrodos de trabajo	71

3.3. Resultados y discusión	72
3.3.1. Caracterización morfológica y estructural de mNPs@C	72
3.3.1-A. Caracterización SEM y TEM.....	72
3.3.1-B. Caracterización por DRX.....	74
3.3.2. Caracterización electroquímica de mNPs@C/CPE	75
3.3.2-A. Efecto de la incorporación de magnetita en la matriz compósito	76
3.3.2-B. Estudio del contenido de mNPs@C en los compósitos.	80
3.3.2-C. Respuesta voltamperométrica para AA y AU.....	84
3.3.3. Construcción de un biosensor de glucosa	87
3.3.4. Desempeño analítico de GOx/mNPs@C/CPE.....	88
3.3.4-A. Determinación de parámetros analíticos	88
3.3.4-B. Estudio de interferentes	92
3.3.4-C. Determinación de parámetros cinéticos.....	93
3.3.5. Estabilidad de la plataforma.....	95
3.3.6. Aplicación de GOx/mNPs@C/CPE	96
3.4. Conclusiones	97
3.5. Bibliografía	98

Capítulo 4: Sensor amperométrico para la cuantificación no enzimática de etanol basado en el empleo de nanohilos de níquel

4.1. Introducción	109
4.2. Metodología experimental	112
4.2.1. Síntesis de NiNW	113

4.2.2 Preparación de los electrodos de trabajo	115
4.3. Resultados y discusión.....	116
4.3.1. Caracterización estructural de NiNWs	116
4.3.2. Caracterización superficial de los compósitos obtenidos.....	118
4.3.3. Caracterización electroquímica de CPE NiNWs.....	120
4.3.3-A. Comportamiento electroquímico de las especies de Ni en medio alcalino.	121
4.3.3-B. Efecto del potencial de corte en el pretratamiento	123
4.3.3-C. Efecto del número de ciclos en el pretratamiento	125
4.3.4. Selección del potencial de trabajo	126
4.3.5. Efecto del contenido de NiNWs en el compósito	127
4.3.6. Evaluación de la respuesta electroquímica del nanocompósito en presencia de etanol	130
4.3.7. Desempeño analítico de CPE 18.0M-NiNWs.....	133
4.3.8. Estabilidad de la plataforma.....	138
4.4. Conclusiones	140
4.5. Bibliografía.....	141

Capítulo 5: Aptasensor impedimétrico para la cuantificación de trombina humana basado en el uso de nanopartículas anisotrópicas de oro

5.1. Introducción.....	151
5.1.1. Nanopartículas anisotrópicas de oro: <i>nanorods</i>	151
5.1.2. Inmovilización de nanopartículas.....	153

5.1.3. Aptámeros como molécula de bio-reconocimiento.	156
5.1.4. α -Trombina humana.....	157
5.2. Metodología experimental	159
5.3. Resultados y discusión	161
5.3.1. Síntesis de nanopartículas anisotrópicas de oro	161
5.3.2. Caracterización de NRsAu.....	164
5.3.2-A. Espectroscopia UV-Vis.....	164
5.3.2-B. Caracterización TEM.....	166
5.3.2-C. Determinación del potencial zeta	168
5.3.3. Construcción de la plataforma de biorreconocimiento	169
5.3.3.1. Adsorción de BPDT sobre electrodos de oro policristalino... 169	
5.3.3.1-A. Optimización de la solución de BPDT	170
5.3.3.1-B. Cálculo del cubrimiento superficial.....	172
5.3.3.2. Inmovilización de NRsAu sobre Au/BPDT.....	173
5.3.3.3. Inmovilización del aptámero anti-trombina humana	176
5.3.4. Aplicación analítica del aptasensor para la determinación de α -trombina	180
5.1.4. Selectividad del aptasensor	184
5.4. Conclusiones	186
5.5. Bibliografía	186

Capítulo 6: Conclusiones generales

6.1. Conclusiones generales.....	201
----------------------------------	-----

RESUMEN

En este trabajo de Tesis Doctoral se sintetizaron y caracterizaron nanoestructuras de magnetita, níquel y oro, las cuales se inmovilizaron en matrices de grafito o sustratos de oro con el objetivo de diseñar plataformas (bio)analíticas para el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos.

En el **Capítulo 1** se presenta una introducción general acerca de la importancia de la utilización de sensores y biosensores en la química analítica y el diseño de nuevas plataformas mediante la incorporación de nanomateriales y biomoléculas. Se describen las características principales de las biomoléculas utilizadas en esta Tesis, enzimas y aptámeros. Además, se presentan distintas metodologías de inmovilización de biomoléculas en la construcción de biosensores.

En el **Capítulo 2** se describen las técnicas utilizadas y se discuten los fundamentos y conceptos necesarios para la comprensión de los resultados presentados. También se detallan los materiales y metodologías utilizadas en este trabajo de Tesis.

En el **Capítulo 3** se reporta el desarrollo de un biosensor destinado a la cuantificación de glucosa basado en el uso de nanopartículas de magnetita recubiertas con carbono amorfo. Se discuten las propiedades electroquímicas de dichas nanopartículas, las ventajas de su incorporación junto a la enzima glucosa oxidasa en un electrodo compuesto para el desarrollo de un biosensor para glucosa. Asimismo, se presenta la optimización de la plataforma a fin de obtener los parámetros analíticos óptimos para el mejor desempeño del biosensor.

En el **Capítulo 4** se presenta el desarrollo de una plataforma electroquímica basada en el empleo de nanohilos de níquel. Esta plataforma fue aplicada para la cuantificación de etanol, tomando ventaja de las propiedades electrocatalíticas del níquel hacia compuestos orgánicos en medio alcalino. Asimismo, se presentan los parámetros analíticos del sensor obtenido.

El **Capítulo 5** detalla la construcción de una superficie de oro modificada basada en la inmovilización de 4,4'-bifenilditiol y el posterior anclaje de nanopartículas anisotrópicas de oro o *nanorods*. La plataforma resultante se utilizó como punto de partida para la inmovilización de un aptámero específico para la detección de α -trombina humana. Adicionalmente, se presenta la optimización en cada etapa de la construcción de la plataforma diseñada para el mejor rendimiento analítico del aptasensor.

En el **Capítulo 6** se exponen las conclusiones generales del presente trabajo de Tesis Doctoral.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis nanostructures of magnetite, nickel and gold were synthesized, were immobilized in graphite matrices or gold substrates to designing (bio)analytical platforms for the development of electrochemical (bio)electrochemicalsensors.

Chapter 1 *presents a general introduction about the importance of the use of sensors and biosensors in analytical chemistry and the design of new platforms through the incorporation of nanomaterials and biomolecules. The main characteristics of the biomolecules used in this Thesis, enzymes and aptamers, were described. In addition, different methodologies of biomolecular immobilization in the construction of biosensors were presented.*

Chapter 2 *describes the techniques used and discusses the fundamentals and concepts necessary for understanding the results presented. The materials and methodologies used in this Thesis are also detailed.*

Chapter 3 *reports the development of a glucose biosensor based on synthesis magnetite nanoparticles coated with amorphous carbon. The electrochemical properties of the nanoparticles, the advantages of its incorporation along with the enzyme glucose oxidase in a composite electrode and the followed strategy for the development of a glucose biosensor were discussed. Likewise, the optimization of the platform was presented in order to obtain the optimal analytical parameters for the best performance of the sensor.*

Chapter 4 presents the development of an electrochemical platform based on nickel nanowires. This platform was applied for the quantification of ethanol, taking advantages of the electrocatalytic properties of nickel towards organic compounds in an alkaline medium. Moreover, the analytical parameters of the sensor were presented.

Chapter 5 details the construction of a modified gold surface based on the immobilization of biphenyl-4,4'-dithiol monolayer and the subsequent anchoring of anisotropic gold nanoparticles or nanorods. This platform was used as a starting point for the immobilization of a specific aptamer for the detection of human α -thrombin. In addition, the optimization at each construction stage of the designed platform for the best analytical performance of the aptasensor, was presented.

In **Chapter 6** were exposed the general conclusions of this Doctoral Thesis work.

PALABRAS CLAVE

Biosensor, nanopartículas, glucosa, magnetita, actividad símil peroxidasa, compuesto de grafito, nanohilos, níquel, etanol, aptámero, α -trombina humana.

KEYWORDS

Biosensor, nanoparticles, glucose, magnetite, peroxidase-like activity, graphite composite, nanowires, nickel, ethanol, aptamer, human α -thrombin.

PUBLICACIONES

“Magnetite NPs@C with Highly-Efficient Peroxidase-Like”

Mercedes Arana, **Cecilia S. Tettamanti**, Paula G. Bercoff, Marcela C. Rodríguez. *Electroanalysis* 26 (2014) 1721-1728.

“Carbon nanotubes-based electrochemical (bio)sensors for biomarkers”

Gustavo Rivas, Marcela Rodríguez, María Dolores Rubianes, Fabiana Gutierrez, Marcos Eguílaz, Pablo Dalmaso, Emiliano Primo, **Cecilia Tettamanti**, María L. Ramírez, Antonella Montemerlo, Pablo Gallay, Concepción Parrado. *Applied materials today* 9 (2017) 566-588.

“Nickel nanowires-based composite material applied to the highly enhanced non-enzymatic electro-oxidation of ethanol”

Cecilia S. Tettamanti, M. Laura Ramírez, Paula Bercoff, Gustavo A. Rivas, Marcela C. Rodríguez. *Microchemical Journal* 142 (2018) 159-166.

“Cysteine functionalized bio-nanomaterial for the affinity sensing of Pb(II) as an indicator of environmental damage”

María L. Ramírez, **Cecilia S. Tettamanti**, Fabiana A. Gutierrez, Jose M. Gonzalez-Domínguez, Alejandro Ansón-Casaos, Javier Hernández-Ferrer, María T. Martínez, Gustavo A. Rivas, Marcela C. Rodríguez. *Microchemical Journal* 141 (2018) 271-278.

ABREVIATURAS

ζ : potencial zeta

φ : ángulo de fase

δ : capa difusional

ω : frecuencia angular

Γ_R : cubrimiento superficial

K_m^{app} : constante de Michaelis-Menten aparente

AA: ácido ascórbico

AAO: óxido de aluminio anodizado

ADN: ácido desoxirribonucleico

ApT: aptámero anti-trombina

ARN: ácido ribonucleico

AU: ácido úrico

AuE: electrodo de oro policristalino

BP: *buffer* fosfato

BPDT: 4,4'-bifenilditiol

BPS: *buffer* fosfato salino

BPT: *buffer* fosfato *Tween*

BSA: albúmina de suero bovino

C_{dc}: capacidad de la doble capa

CPE: electrodos compuesto de pasta de carbono

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DRX: difracción de rayos X

E°: potencial estándar

E_{ac}: potencial sinusoidal

E_c: potencial de corte

EDS: emisión de rayos X

E_f: potencial final

E_i: potencial inicial

EIE: espectroscopia de impedancia electroquímica

ER: electrones retodispersados

ES: electrones secundarios

EtOH: etanol

***f*:** frecuencia

GOx: glucosa oxidasa

I_{ac}: amplitud de corriente en el estado estacionario

I_{ee}: corriente de estado estacionario

I_{max}: corriente máxima

I_p: corriente de pico

I_{pa}: corriente de pico anódica

I_{pc}: corriente de pico catódica

K_m: constante de Michaelis-Menten

LD: límite de detección

LQ: límite de cuantificación

LSPR: resonancia del plasmón superficial longitudinal

mMicroPs: micropartículas de magnetita comerciales

mNPs: nanopartículas de magnetita

mNPs@C: nanopartículas de magnetita recubiertas con carbono

NiNWs: nanohilos de níquel

NMs: nanomateriales

NPs: nanopartículas

NPsAu: nanopartículas de oro

NRs: nanobarras, nanorods, nanovarillas

NTs: nanotubos

NWs: nanohilos

PC: policarbonato

P_L: pico correspondiente al plasmón longitudinal

P_T: pico correspondiente al plasmón transversal

R²: coeficiente de correlación lineal

IL: intervalo lineal

R_s: resistencia de la solución

R_{tc}: resistencia a la transferencia de carga

S: sensibilidad

SAMs: monocapas autoensambladas

SELEX: evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial

SEM: microscopía electrónica de barrido

ssDNA: ácido desoxirribonucleico de cadena simple

TCEP: tris (2-carboxietil) fosfina

TEM: microscopía de transmisión electrónica

TRO_H: trombina humana

TSPR: resonancia del plasmón superficial transversal

UV-VIS: espectroscopia ultravioleta visible

V_B: velocidad de barrido

VC: voltamperometría cíclica

VH: voltamperometría hidrodinámica

V_m: velocidad máxima de reacción

Z: impedancia

Z': impedancia real

Z'': impedancia imaginaria

Z_w: impedancia de Warburg

ΔE_p: diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico

Θ: cubrimiento superficial

Capítulo 1

Introducción general

Capítulo 1

1.1. Sensores y biosensores

El desarrollo de sensores y biosensores es actualmente uno de los tópicos de relevancia en la investigación de la química analítica. Tras la evolución de nuevas tecnologías existe un creciente interés en el desarrollo de dispositivos que permitan obtener resultados fiables de manera rápida, sencilla y económica, en tiempo real y de forma directa, en reemplazo de las técnicas convencionales. Esto es particularmente importante en la industria farmacéutica y alimenticia, con el fin de poder realizar controles de calidad para optimizar la producción industrial; en el diagnóstico clínico, para el seguimiento descentralizado de pacientes; y en la vigilancia medioambiental, para la detección y monitoreo de contaminantes ambientales. Es por ello que, las investigaciones en el campo de los sensores, se han dirigido a encontrar soluciones a dichas necesidades a través de la implementación de diversas tecnologías [1,2].

Los sensores presentan numerosas ventajas sobre otras metodologías analíticas más complejas, como por ejemplo, el tiempo corto de análisis, la facilidad operacional, la utilización de un volumen reducido de muestra y en muchos casos sin la realización de un pretratamiento, y la posibilidad de diseñar dispositivos miniaturizados portables para la realización de estudios de campo. Es por ello que durante los últimos años, se han realizado múltiples esfuerzos para diseñar sensores que exhiban características adecuadas como selectividad, límites de detección sumamente bajos, reversibilidad y robustez [3]

Los sensores son dispositivos que tienen incorporado un receptor junto a un transductor de la señal, tal como muestra la **Figura 1-1**. Se puede distinguir: el receptor, el cual interactúa directamente con la muestra a analizar, y responde

selectivamente al analito en cuestión; y el transductor el cual es capaz de transformar la señal fisicoquímica producida como consecuencia del evento de reconocimiento, en una señal analíticamente medible, proporcionando información cuantitativa o semicuantitativa. Dicha señal, puede provenir de una reacción química del analito o de un cambio físico producido en el sistema investigado. De esta manera, de acuerdo con el tipo de información que son capaces de proporcionar, existen dos clases de sensores: los físicos, que detectan cambios como temperatura, presión, entre otros, y los sensores químicos, basados en la detección de cambios de pH, concentración de un analito en particular, composición química [4,5].

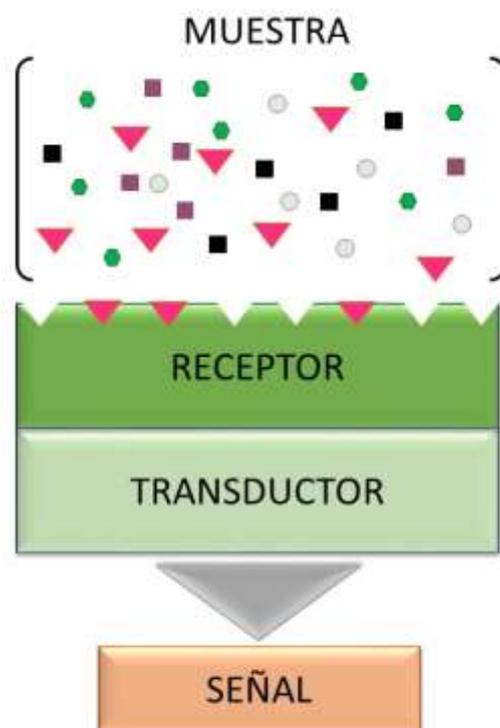


Figura 1-1. Esquema de un sensor y sus componentes.

Entre los sensores químicos cabe destacar a los biosensores, ya que son los dispositivos que presentan generalmente mayor selectividad y por lo tanto con potencialidad de aplicación en la química analítica. De acuerdo con la IUPAC un

biosensor es un dispositivo que contiene como receptor un elemento de reconocimiento biológico [4,5].

Generalmente, los sensores pueden clasificarse según el tipo de transductor utilizado, y para el caso particular de los biosensores, se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la biomolécula inmovilizada en la capa de biorreconocimiento [4]. A continuación se hace una breve descripción de cada uno de ellos, haciendo énfasis en los (bio)sensores electroquímicos, ya que son los reportados en este trabajo de Tesis.

1.1.1. Clasificación según el tipo de transductor

- **Ópticos:** se basan en la interacción del analito con la radiación electromagnética. Transforman los cambios producidos por la interacción de un analito con el receptor en una señal óptica. Por ejemplo absorbancia, reflectancia, luminiscencia, resonancia del plasmón superficial, fluorescencia. Una de las características principales es que son altamente sensibles y selectivos, permitiendo determinaciones directas en tiempo real [6–11].

- **Acústicos/mecánicos:** los transductores están compuestos por materiales piezoeléctricos, los cuales sufren pequeñas deformaciones en función de un campo eléctrico aplicado. Estos dispositivos detectan el cambio en la frecuencia de oscilación del cristal, debido al cambio de masa a causa de un evento de reconocimiento molecular. Ejemplo de ello son los sensores de ondas acústicas (SAW) y la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) [12–14].

- **Térmicos/calorimétricos:** son capaces de medir un cambio de calor sobre la superficie del electrodo, a causa de la adsorción de una especie o por una reacción química [15–18].

- **Electroquímicos:** están basados en una reacción de transferencia de carga entre el analito, un mediador redox o un producto de una reacción y el

electrodo; o un cambio superficial que produce la modificación de parámetros electroquímicos (como por ejemplo la resistencia a la transferencia de carga, conductividad, entre otros). Estos sensores representan una subclase importante de los sensores químicos, ya que son los más robustos, simples y económicos en comparación con sensores que utilizan otro tipo de transductor. Además, generalmente poseen un amplio intervalo lineal y tiempos de respuesta cortos. De la misma manera, los equipos necesarios para recolectar la señal (potenciostatos y conductímetros) son pequeños, económicos y de fácil manipulación lo cual favorece la miniaturización de los sistemas de detección. Los sensores electroquímicos se pueden sub-clasificar como amperométricos, potenciométricos, impedimétricos y conductimétricos, dependiendo de la variable a utilizar para efectuar la detección del evento de reconocimiento [19].

Los sensores **amperométricos** miden la corriente producida por la oxidoreducción de una especie electroactiva bajo la acción de un potencial constante. La magnitud de la corriente está relacionada con la concentración de la especie en solución. Existe una amplia variedad de especies electroactivas y, por lo tanto, en muchos casos se requiere un elemento que brinde una selectividad adicional para poder discriminar entre varias especies. El empleo de enzimas es una alternativa generalmente utilizada para solucionar tal inconveniente, proporcionando selectividad al biosensor [20–22].

En sensores **potenciométricos** se emplea una membrana que es sensible y selectiva a una dada especie, donde se establece una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana entre dos electrodos separados por ésta. La diferencia de potencial entre los electrodos indicador y de referencia, es proporcional al logaritmo de la concentración de la especie activa, mientras que la corriente generada es despreciable. Un ejemplo de este tipo de sensores son los electrodos de pH o los electrodos selectivos para iones sodio, potasio, litio y flúor, entre otros [23–25].

El sistema **conductimétrico** emplea dos pares de electrodos en una configuración plana. Se determinan los cambios en la conductancia asociados a cambios en la concentración de iones de las soluciones. Generalmente, se realiza una medición diferencial entre el sensor en ausencia y en presencia del elemento biológico [26,27].

Los sensores **impedimétricos** responden a cambios en la resistencia eléctrica de un sistema, a causa de los fenómenos que ocurren en la superficie del electrodo. La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica se ha convertido en una herramienta popular para la detección de una amplia gama de moléculas biológicas, lo cual queda demostrado con el aumento de publicaciones basadas en biosensores impedimétricos en los últimos años. La señal del transductor se basa principalmente en la detección de interacciones de afinidad entre el receptor biológico y la molécula blanco. Dichas interacciones causan un cambio en la cinética de transferencia electrónica, entre una sonda redox en la solución y la superficie conductora. Este cambio es detectable como una variación en la resistencia de transferencia de carga, que aumenta o disminuye de modo proporcional al número de moléculas que se unen al elemento de biorreconocimiento [28–31].

1.1.2. Clasificación por la capa de biorreconocimiento

Existen diferentes tipos de elementos de biorreconocimiento que se pueden inmovilizar sobre los transductores y de acuerdo con su naturaleza, características y propiedades, los biosensores se clasifican en:

- **Biosensores catalíticos:** se basan en la utilización de biocatalizadores, los cuales son elementos que favorecen la ocurrencia de una reacción química a partir de un sustrato, dando como resultado un producto. Dentro de este tipo de elementos de biorreconocimiento cabe destacar a las

enzimas (sistemas mono o multi-enzimáticos), células completas (bacterias, hongos, etc.) u organelas celulares, tejidos (animales o vegetales). Dentro de los biosensores, los enzimáticos son los más desarrollados y utilizados. En general, la reacción enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, lo cual es de gran utilidad en aplicaciones analíticas. En este tipo de sistemas, uno o más analitos (denominados sustratos) reaccionan en presencia del biocatalizador para generar productos. Existen diversas estrategias para el seguimiento de la reacción catalizada. En algunos casos, se puede detectar el consumo de un co-sustrato (por ejemplo el consumo de oxígeno por una enzima oxidasa o bacterias), observando el decaimiento de la señal inicial; en otros casos la detección de uno de los productos de reacción (como es el caso del peróxido de hidrógeno generado por oxidasas), evidenciándose a través del incremento de la señal; también se puede evaluar la transferencia directa de electrones entre el sitio activo de una enzima redox y el transductor electroquímico; o indirectamente utilizando un mediador redox inmovilizado que reaccione de manera suficientemente rápida con el biocatalizador y sea fácilmente detectable por el transductor [32–34].

- **Biosensores de afinidad:** se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de biorreconocimiento sin que ocurra una reacción química, sino que se produce una interacción de afinidad del tipo ligando-receptor. Como la reacción de reconocimiento no genera productos detectables, es necesario utilizar técnicas de transducción asociadas al proceso de interacción en sí, tales como cambios de masa, modificación de propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas. Las biomoléculas que exhiben interacciones de afinidad son anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, péptidos y receptores proteicos. En este grupo se destacan los inmunosensores (reacciones antígeno-anticuerpo), los aptasensores (interacción aptámero-molécula blanco) y los biosensores de ADN (hibridación de secuencias de ADN de simple hebra con su hebra complementaria).

La gran especificidad y afinidad de este tipo de interacciones le confiere a esta clase de biosensores una especial selectividad y sensibilidad.

Si bien la selectividad de un biosensor se basa principalmente en la especificidad del elemento de reconocimiento molecular, varios parámetros analíticos, como la sensibilidad, el tiempo de respuesta y el límite de detección, dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del transductor. Estas propiedades pueden mejorarse mediante la utilización de materiales adecuados (por ejemplo nanomateriales) diseñando nuevas arquitecturas y superficies modificadas [11,35–40].

1.2. Enzimas

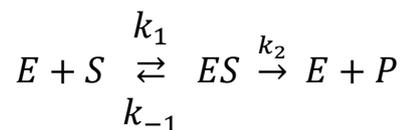
Las enzimas catalizan reacciones químicas en sistemas biológicos. El grupo de fenómenos asociados con la aceleración de las reacciones electroquímicas en presencia de las enzimas se puede definir como bioelectrocatalisis. En algunas situaciones la actividad redox de la enzima depende de su propia estructura y en otros casos, es necesaria la presencia de co-factores, los cuales pueden ser iones metálicos ($\text{Fe}^{2+/3+}$, Zn^{2+} , Na^+ , $\text{Cu}^{+/2+}$, Mg^{2+}) o moléculas orgánicas (FAD, NAD, coenzima Q).

Estas biomoléculas han sido ampliamente utilizadas en biosensores, debido no sólo a su poder catalítico, sino a la extraordinaria selectividad que poseen [2]. Adicionalmente, las enzimas combinan el evento de reconocimiento y la amplificación de la señal, características imprescindibles en el desarrollo de biosensores. Las enzimas requieren de condiciones de trabajo controladas como pH, temperatura, fuerza iónica y presión. Bajo condiciones extremas pueden desnaturalizarse y perder su actividad debido a la pérdida de su estructura terciaria.

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, entre las cuales se encuentran:

- transferasas (catalizan la reacción de un grupo químico de un sustrato a otro),
- liasas (catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos),
- isomerasas (catalizan la conversión de isómeros),
- ligasas (catalizan la formación de enlaces C-C, C-S C-O y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP),
- óxido-reductasas, las cuales mas participan de reacciones donde ocurre una transferencia de electrones, intercambiando además átomos de hidrógeno u oxígeno, es por esto que son más utilizadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Entre ellas se pueden destacar las deshidrogenasas, oxidasas y oxigenasas.

En general las reacciones enzimáticas, siguen cinéticas de reacción convencionales:



donde el sustrato S se combina con la enzima E, para formar el complejo enzima-sustrato ES, que posteriormente forma un producto P, liberando la enzima. A una concentración de enzima fija, la velocidad de reacción V sigue la cinética de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = V_m [S]/(K_m + [S]) \quad \text{Ec.1-1.}$$

Donde K_m es la constante de Michaelis-Menten y V_m es la velocidad máxima de reacción. Cuando la constante K_m es igual a la concentración de sustrato, la

velocidad de la reacción es igual a la mitad de V_m . En la construcción de electrodos enzimáticos, es deseable obtener una V_m de reacción alta y un K_m bajo.

La **Figura 1-2** muestra la dependencia de la velocidad de reacción de la enzima en función de la concentración de sustrato, junto con los parámetros K_m y V_m . Como se puede observar, en un inicio la velocidad aumenta proporcionalmente a la concentración de sustrato hasta alcanzar la saturación, después de lo cual el agregado de sustrato no provoca aumento en la velocidad. Por consiguiente, valores de K_m bajos, ofrecen una mayor sensibilidad y dan como resultado un intervalo lineal más acotado. De la discusión anterior, se asume que la reacción obedece a una cinética de Michaelis-Menten. Experimentalmente, el intervalo lineal puede exceder la concentración correspondiente al K_m , debido a que la concentración local de sustrato en la región cercana al electrodo es a menudo más baja que la concentración en el seno de la solución [1,2].

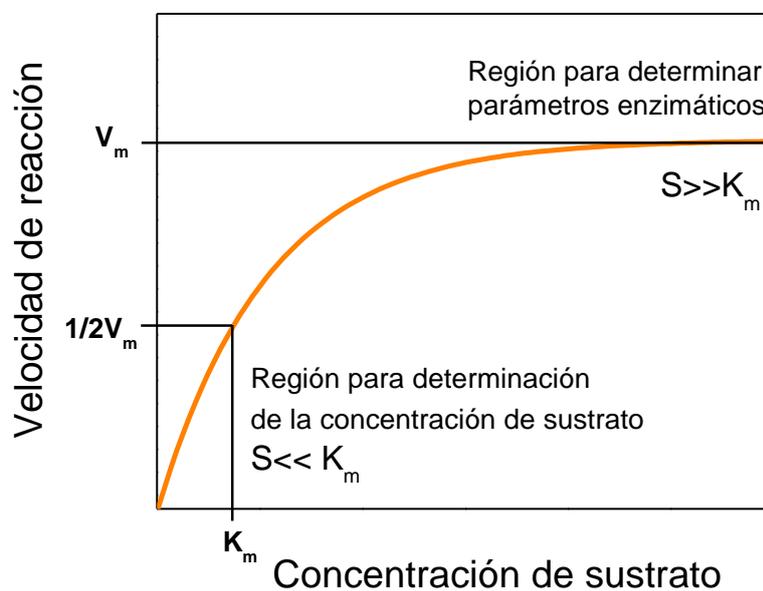


Figura 1-2. Dependencia de la velocidad de reacción catalizada por enzimas en función de la concentración del sustrato.

Los parámetros cinéticos de una enzima inmovilizada en un biosensor, K_m y V_m , se pueden obtener experimentalmente a partir del reordenamiento y linealización de la **ecuación 1-1**. Existen varios métodos para la determinación de estos parámetros, *Lineweaver-Burk*, *Eadie-Hofstee*, *Hanes-Woolf* y *Cornish-Bowden*. Los cuatro involucran la determinación de la velocidad en función de la concentración de sustrato, a una concentración de enzima constante [41–43]. En este trabajo de Tesis se utilizó el método de *Eadie-Hofstee*, el cual se describe a continuación.

Para un biosensor enzimático amperométrico la velocidad del proceso estará dada por la corriente generada debido a la reacción electroquímica. Por lo tanto los parámetros cinéticos se pueden obtener a partir de la **ecuación 1-2**.

$$I_{ee} = I_{max} - K_m^{app} (I_{ee} / C) \quad \text{Ec. 1-2.}$$

donde I_{ee} es la corriente en estado estacionario, I_{max} es la corriente máxima en condiciones de estado estacionario, K_m^{app} es la constante de Michaelis-Menten aparente y C es la concentración del sustrato en solución [41–43]. De esta manera, a partir de los valores obtenidos experimentalmente, se puede conocer si la enzima conserva su actividad en el microambiente de la matriz electródica.

1.3. Aptámeros

En los años noventa dos grupos de investigación diferentes reportaron simultáneamente la selección *in vitro* y amplificación de un ácido nucleico con alta afinidad hacia una molécula blanco determinada [44,45]. Luego, estos oligonucleótidos fueron llamados aptámeros, palabra que proviene del latín *aptus* y significa fijar o encajar.

Los aptámeros son oligonucleótidos cortos de cadena simple, los cuales pueden ser ssADN o ARN. Son moléculas pequeñas, que pueden pesar entre 5-25 KDa. La unión a la molécula *target* está dada por interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlaces puente hidrógeno, o una combinación de estos fenómenos, sumado a un cambio conformacional que da como resultado la formación de una estructura tridimensional del aptámero sumamente estable para un reconocimiento altamente específico [46–50]. Existe una amplia variedad de aptámeros que pueden reconocer moléculas pequeñas (por ejemplo iones, ATP, cocaína, estradiol), macromoléculas (trombina, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento endotelial vascular, entre otros) o incluso células enteras (como CD44, CD133) [47]. Además, se han desarrollado distintos aptámeros para una molécula en particular, que reconocen selectivamente diferentes regiones de la misma [46]. La afinidad con la que los aptámeros se unen a su molécula blanco es comparable con la unión del complejo antígeno-anticuerpo, es por ello que los aptámeros son llamados “anticuerpos sintéticos” y por lo tanto, pueden ser utilizados en reemplazo de los anticuerpos tanto en aplicaciones terapéuticas como diagnósticas. Las constantes de disociación que presentan los aptámeros se encuentran en un intervalo de nM a pM, comparables con los anticuerpos monoclonales e incluso en ocasiones pueden ser mejores [51,52].

El interés de la utilización de estas moléculas en biosensores como sustituyentes de los anticuerpos surge de numerosas ventajas que presentan los aptámeros. Principalmente, su método de obtención por síntesis química, sin la necesidad de la inmunización *in vivo* de animales de experimentación. Además, una vez identificada la secuencia, los aptámeros se pueden sintetizar con alta pureza y reproducibilidad, a un costo relativamente bajo. Otra ventaja que poseen los aptámeros es que, dependiendo de la funcionalidad deseada, se pueden modificar químicamente con facilidad, empleando sondas fluorescentes, grupos funcionales, inhibidores, indicadores electroquímicos, nanopartículas o enzimas

[46]. Tales modificaciones permiten, por ejemplo, inmovilizar estas biomoléculas en soportes sólidos o utilizar diferentes metodologías de detección.

En contraste con los anticuerpos, que en ciertas condiciones se pueden desnaturalizar irreversiblemente, los aptámeros poseen una alta estabilidad, ya que bajo ciertas condiciones (cambios de temperatura, valores extremos de pH, elevada fuerza iónica) se pueden regenerar sin pérdida de su integridad y selectividad [53].

La metodología de síntesis de los aptámeros es un procedimiento *in vitro* denominado SELEX (por sus siglas en inglés, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) que consiste en ciclos de selección iterativos, enriqueciendo en cada ciclo las moléculas que se unen con mayor afinidad a un *target* determinado. Este procedimiento se esquematiza en la **Figura 1-2**. El proceso se inicia con una biblioteca de oligonucleótidos sintéticos (generalmente entre 10^{15} - 10^{16}), los cuales son empleados como muestra inicial para la selección. Este conjunto de oligonucleótidos tiene una región central aleatoria, y dos secuencias constantes y definidas en los extremos 3' y 5', necesarias para la posterior amplificación. Cuando la molécula blanco se pone en contacto con esta biblioteca de oligonucleótidos, unos pocos ácidos nucleicos se unirán con alta afinidad y los que se adsorban inespecíficamente serán luego excluidos. Posteriormente, las secuencias afines son separadas de la molécula blanco para la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Después de un cierto número de ciclos de selección, que va entre los 6 y 18, durante los cuales la muestra se encuentra enriquecida en oligonucleótidos con mayor afinidad hacia la molécula blanco, se procede al clonado y secuenciado para la identificación del oligonucleótido de interés que presenta la máxima afinidad [54,55].

Por las características antes mencionadas, los aptámeros han surgido como alternativa al empleo de anticuerpos para su aplicación en diferentes áreas como el desarrollo de biosensores de afinidad [49,56–61], bio-imágenes [62,63],

diagnóstico [63,64], como herramientas terapéuticas [65–67] y administración de fármacos [62,68–70]. Además, los aptámeros, como elementos de reconocimiento biomolecular, desempeñan funciones importantes en el diseño de biosensores colorimétricos, fluorescentes, acústicos, plasmónicos y electroquímicos [47].



Figura 1-2. Ilustración esquemática del proceso SELEX para la selección de un nuevo aptámero.

1.4. Inmovilización de biomoléculas

Un aspecto muy importante a tener en cuenta en el diseño y construcción de nuevas plataformas es la inmovilización del elemento de biorreconocimiento, ya que el funcionamiento del biosensor dependerá en gran medida de este proceso. El objetivo fundamental de la inmovilización es permitir el contacto íntimo entre la biomolécula y el transductor sin alterar la funcionalidad y estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Estos métodos comprenden procesos físicos, fundamentalmente atrapamiento o adsorción, y procesos químicos, dentro de los cuales se destacan la unión por enlace covalente

o entrecruzamiento. Para cada uno de ellos existen numerosas variantes y además es posible utilizar diversas combinaciones [1,4].

- **Atrapamiento:** consiste en la inmovilización física de la biomolécula en geles, redes poliméricas o matrices de carbono, sin que ocurra unión química entre ésta y la matriz. El inconveniente que presenta esta metodología, es la generación de barreras difusionales que modifican el flujo del sustrato o del producto. Es preciso señalar que, la inclusión en matrices de carbono es un método ampliamente utilizado en la construcción de electrodos compósito debido a su simplicidad y versatilidad en la preparación [71].

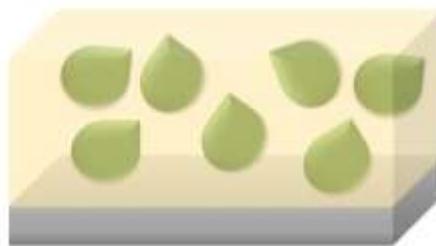


Figura 1-3. Inmovilización de biomoléculas por atrapamiento.

- **Entrecruzamiento:** este método consiste en la utilización de reactivos bifuncionales (dialdehidos, diaminoésteres, sales de diazonio) que originan uniones intermoleculares. Un compuesto muy utilizado que favorece el entrecruzamiento es el glutaraldehído. La principal desventaja de este tipo de inmovilización, es el bajo control del grado de entrecruzamiento, lo que puede conducir a una pérdida en actividad biológica de la biomolécula, debido a posibles cambios en su estructura conformacional.

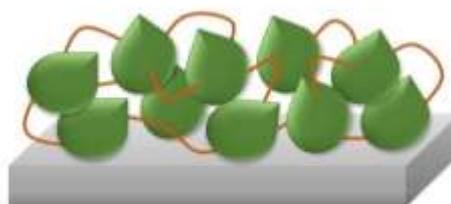


Figura 1-4. Inmovilización de biomoléculas por entrecruzamiento.

- **Adsorción directa:** es un método simple que consiste en la interacción de la biomolécula mediante fuerzas electrostáticas o interacciones hidrofóbicas sobre la superficie (**Figura 1-5**). La desventaja de este método es que es poco estable, por lo que la biomolécula puede desorberse de la superficie, frente a mínimos cambios en las condiciones del medio.

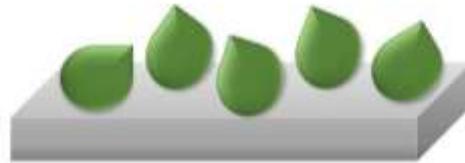


Figura 1-5. Inmovilización de biomoléculas por adsorción sobre la superficie.

- **Interacción covalente:** se basa en la activación o generación de grupos funcionales en el transductor para efectuar la unión covalente con la biomolécula. Una ventaja muy importante que presenta esta metodología frente a las demás, es la posibilidad de controlar la orientación de la biomolécula y la estabilidad otorgada por la unión química. En esta técnica se debe prestar especial atención para que la inmovilización no ocasione pérdida en la funcionalidad y bioactividad de la molécula. En relación al uso de esta alternativa, la fabricación de monocapas autoensambladas de tioles (SAMs) constituye una metodología muy adecuada para la inmovilización de distintas moléculas como aptámeros, anticuerpos, ADN, entre otros. Las configuraciones basadas en SAMs se caracterizan por presentar una menor adsorción inespecífica y permitir un mejor control de la orientación de la biomolécula (**Figura 1-6**).



Figura 1-6. Inmovilización de biomoléculas mediante unión covalente.

1.5. Nanomateriales

Los nanomateriales (NMs) se caracterizan por tener al menos una de sus dimensiones dentro del rango de la escala nanométrica (hasta 100 nm). Existe una amplia variedad de producción de nanomateriales de diferente forma, tamaño y composición química. Estos pueden ser considerados como:

- materiales **cero dimensionales (0-D)**, los cuales son estructuras puntuales con escala nanométrica en todas sus dimensiones, un ejemplo de ellos son los *fullerenos* y *quantum dots* [72,73];
- materiales **unidimensionales (1-D)**, son estructuras con tamaño nanométrico en una sola dimensión, como los nanotubos (NTs), nanobarras o *nanorods* (NRs) y nanohilos (NWs) [72,74,75];
- materiales **bidimensionales (2-D)**, poseen una estructura planar nanométrica, como por ejemplo el grafeno y las nanoláminas [72,73];
- materiales **tridimensionales (3-D)**, poseen un tamaño similar en todas sus dimensiones y usualmente están formados por combinación de nanoestructuras [76–78].

En la **Figura 1-7** se muestran varios ejemplos de nanomateriales.

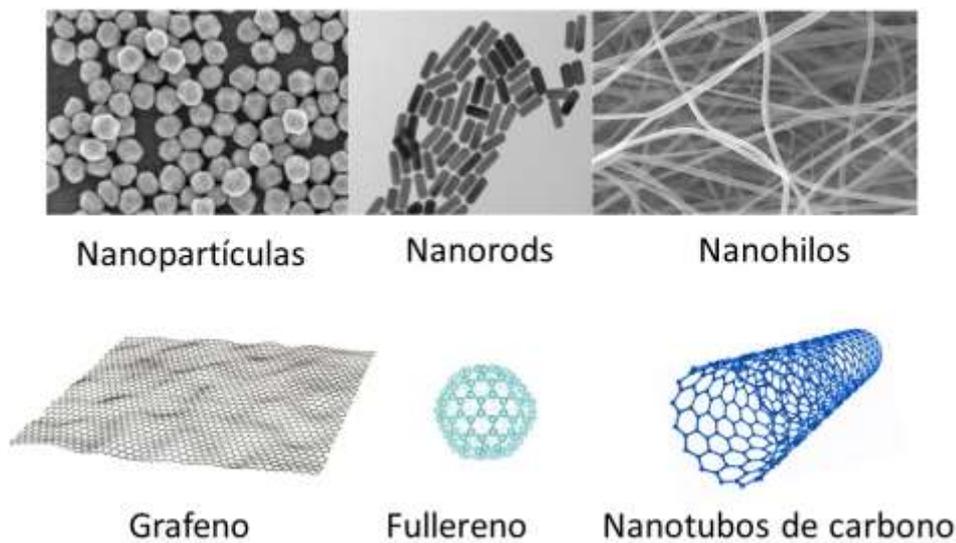


Figura 1-7. Ejemplos de nanomateriales.

Las materiales nanoestructurados exhiben propiedades físicas y químicas sobresalientes que difieren significativamente respecto al material masivo (*bulk*) de la misma composición. Dentro de estas propiedades se pueden destacar su alta relación superficie/volumen, su habilidad para ser funcionalizados, sus notables características electrónicas y térmicas, y su efecto electrocatalítico [79]. Es por esto, que los NMs desempeñan un papel cada vez más importante en el diseño y desarrollo de dispositivos sensores y biosensores, demostrando importantes avances en el campo de la química electroanalítica [28,75]. Los NMs pueden mejorar la eficiencia de las plataformas de (bio)reconocimiento de diversas maneras, tanto por parte de la capa de reconocimiento como en lo que respecta al transductor. Por ejemplo, algunos pueden incrementar el área superficial permitiendo la inmovilización de un mayor número de biomoléculas y a su vez mejorar la transferencia electrónica. Asimismo, los NMs del tipo conductor y catalítico están involucrados en las estrategias de amplificación de la señal. Una característica que los hace más interesantes aún, es que la mayoría de ellos son multifuncionales y pueden desempeñar varios roles en un mismo sistema [80].

En esta Tesis se emplearon nanopartículas de magnetita recubiertas con carbono, nanohilos de níquel y *nanorods* de oro en el diseño de plataformas (bio)sensoras para la cuantificación de diferentes analitos de interés.

1.5. Bibliografía

- [1] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [2] J. Wang, *Analytical electrochemistry - 3rd Edition*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [3] O.S. Wolfbeis, *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Frontiers in Chemical Sensors, Methods and Applications*, 2006. doi:10.1007/b100321.
- [4] D. R.Thevenot, K. Toth, R.A. Durdt, G.S. Wilson, *Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification (Technical Report) IUPAC, PURE Appl. Chem.* 71 (1999) 2333–2348. doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- [5] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Chemical Sensors - Definitions and Classifications*, *Int. Union Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250. doi:10.1351/pac199163091247.
- [6] R. Méjard, H.J. Griesser, B. Thierry, *Optical biosensing for label-free cellular studies*, *Trends Anal. Chem.* 53 (2014) 178–186. doi:10.1016/j.trac.2013.08.012.
- [7] E.N. Primo, S. Bollo, M.D. Rubianes, G.A. Rivas, *Immobilization of graphene-derived materials at gold surfaces: Towards a rational design of protein-based platforms for electrochemical and plasmonic applications*,

-
- Electrochim. Acta. 259 (2018) 723–732.
doi:10.1016/j.electacta.2017.10.184.
- [8] M. Matsishin, A. Rachkov, A. Lopatynskiy, V. Chegel, A. Soldatkin, A. El'skaya, Selective Amplification of SPR Biosensor Signal for Recognition of *rpoB* Gene Fragments by Use of Gold Nanoparticles Modified by Thiolated DNA, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 0–5. doi:10.1186/s11671-017-2031-y.
- [9] M.E. Gallina, Y. Zhou, C.J. Johnson, D. Harris-Birtill, M. Singh, H. Zhao, D. Ma, T. Cass, D.S. Elson, Aptamer-conjugated, fluorescent gold nanorods as potential cancer theradiagnostic agents, *Mater. Sci. Eng. C.* 59 (2016) 324–332. doi:10.1016/j.msec.2015.09.101.
- [10] F. Fathi, A. Rezaabakhsh, R. Rahbarghazi, M.R. Rashidi, Early-stage detection of VE-cadherin during endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells using SPR biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 96 (2017) 358–366. doi:10.1016/j.bios.2017.05.018.
- [11] Q. Liu, X.L. Xie, C.J. Mao, J.S. Chen, H.L. Niu, J.M. Song, Electrochemiluminescent biosensor with DNA link for selective detection of human IgG based on steric hindrance, *Talanta.* 194 (2019) 745–751. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.092.
- [12] G. Bayramoglu, C. Ozalp, M. Oztekin, U. Guler, B. Salih, M.Y. Arica, Design of an aptamer-based magnetic adsorbent and biosensor systems for selective and sensitive separation and detection of thrombin, *Talanta.* 191 (2019) 59–66. doi:10.1016/j.talanta.2018.08.048.
- [13] Y. Lian, F. He, H. Wang, F. Tong, A new aptamer/graphene interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid and specific detection of *Staphylococcus aureus*, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 314–319. doi:10.1016/j.bios.2014.10.017.
- [14] M.A.D. Neves, C. Blaszykowski, S. Bokhari, M. Thompson, Ultra-high

frequency piezoelectric aptasensor for the label-free detection of cocaine, *Biosens. Bioelectron.* 72 (2015) 383–392. doi:10.1016/j.bios.2015.05.038.

- [15] J. Xu, F.L. Jiang, Y. Liu, B. Kiesel, T. Maskow, An enhanced bioindicator for calorimetric monitoring of prophage-activating chemicals in the trace concentration range, *Eng. Life Sci.* 18 (2018) 475–483. doi:10.1002/elsc.201800026.
- [16] D. Gaddes, W.B. Reeves, S. Tadigadapa, Calorimetric Biosensing System for Quantification of Urinary Creatinine, *ACS Sensors.* 2 (2017) 796–802. doi:10.1021/acssensors.7b00161.
- [17] R. Chinnappan, S. Al Attas, W.E. Kaman, F.J. Bikker, M. Zourob, Development of magnetic nanoparticle based calorimetric assay for the detection of bovine mastitis in cow milk, *Anal. Biochem.* 523 (2017) 58–64. doi:10.1016/j.ab.2017.02.009.
- [18] H. Diliën, M. Peeters, J. Royackers, J. Harings, P. Cornelis, P. Wagner, E. Steen Redeker, C.E. Banks, K. Eersels, B. Van Grinsven, T.J. Cleij, Label-Free Detection of Small Organic Molecules by Molecularly Imprinted Polymer Functionalized Thermocouples: Toward in Vivo Applications, *ACS Sensors.* 2 (2017) 583–589. doi:10.1021/acssensors.7b00104.
- [19] B.C. Janegitz, T.A. Silva, A. Wong, L. Ribovski, F.C. Vicentini, M.D.P. Taboada Sotomayor, O. Fatibello-Filho, The application of graphene for in vitro and in vivo electrochemical biosensing, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 224–233. doi:10.1016/j.bios.2016.03.026.
- [20] S. Preecharueangrit, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, A. Numnuam, Amperometric sensing of sulfite using a gold electrode coated with ordered mesoporous carbon modified with nickel hexacyanoferrate, *J. Electroanal. Chem.* 808 (2018) 150–159. doi:10.1016/j.jelechem.2017.11.070.
- [21] A. Jędrzak, T. Rębiś, Ł. Kłapiszewski, J. Zdarta, G. Milczarek, T. Jesionowski,

- Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 256 (2018) 176–185. doi:10.1016/j.snb.2017.10.079.
- [22] H. Jo, J. Her, H. Lee, Y.B. Shim, C. Ban, Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes, *Talanta*. 165 (2017) 442–448. doi:10.1016/j.talanta.2016.12.091.
- [23] A. Tarasov, D.W. Gray, M.Y. Tsai, N. Shields, A. Montrose, N. Creedon, P. Lovera, A. O’Riordan, M.H. Mooney, E.M. Vogel, A potentiometric biosensor for rapid on-site disease diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 669–678. doi:10.1016/j.bios.2015.12.086.
- [24] C. Zuliani, G. Matzeu, D. Diamond, A potentiometric disposable sensor strip for measuring pH in saliva, *Electrochim. Acta.* 132 (2014) 292–296. doi:10.1016/j.electacta.2014.03.140.
- [25] V. Belikova, V. Panchuk, E. Legin, A. Melenteva, D. Kirsanov, A. Legin, Continuous monitoring of water quality at aeration plant with potentiometric sensor array, *Sensors Actuators B Chem.* 282 (2019) 854–860. doi:10.1016/j.snb.2018.11.153.
- [26] M. Torres-Luque, J.F. Osma, M. Sánchez-Silva, E. Bastidas-Arteaga, F. Schoefs, Chlordetect: Commercial calcium aluminate based conductimetric sensor for chloride presence detection, *Sensors.* 17 (2017). doi:10.3390/s17092099.
- [27] J. Zhang, J. Wang, X. Zhang, F. He, Rapid detection of *Escherichia coli* based on 16S rDNA nanogap network electrochemical biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 118 (2018) 9–15. doi:10.1016/j.bios.2018.07.041.
- [28] J. Muñoz, R. Montes, M. Baeza, Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization,

architecture surface and bio-sensing, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 201–215. doi:10.1016/j.trac.2017.08.012.

- [29] L. Jiang, J. Qian, X. Yang, Y. Yan, Q. Liu, K. Wang, K. Wang, Amplified impedimetric aptasensor based on gold nanoparticles covalently bound graphene sheet for the picomolar detection of ochratoxin A, *Anal. Chim. Acta.* 806 (2014) 128–135. doi:10.1016/j.aca.2013.11.003.
- [30] H. Jafari, M. Amiri, E. Abdi, S.L. Navid, J. Bouckaert, R. Jijie, R. Boukherroub, S. Szunerits, Entrapment of uropathogenic *E. coli* cells into ultra-thin sol-gel matrices on gold thin films: A low cost alternative for impedimetric bacteria sensing, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 161–166. doi:10.1016/j.bios.2018.10.029.
- [31] A.L. Rinaldi, E. Rodríguez-Castellón, S. Sobral, R. Carballo, Application of a nickel hydroxide gold nanoparticles screen-printed electrode for impedimetric sensing of glucose in artificial saliva, *J. Electroanal. Chem.* 832 (2019) 209–216. doi:10.1016/j.jelechem.2018.11.008.
- [32] W. Li, L. Zhang, Q. Li, S. Wang, X. Luo, H. Deng, S. Liu, Porous structured cellulose microsphere acts as biosensor for glucose detection with “signal-and-color” output, *Carbohydr. Polym.* 205 (2019) 295–301. doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.084.
- [33] T. Chen, Y. Xu, S. Wei, A. Li, L. Huang, J. Liu, A signal amplification system constructed by bi-enzymes and bi-nanospheres for sensitive detection of norepinephrine and miRNA, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 224–232. doi:10.1016/j.bios.2018.10.030.
- [34] V. V. Shumyantseva, A. V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T. V. Bulko, A.I. Archakov, From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450, *Biosens. Bioelectron.* 121 (2018) 192–204. doi:10.1016/j.bios.2018.08.040.
- [35] T.A.R. Cordeiro, M.V.C. Gonçalves, D.L. Franco, A.B. Reis, H.R. Martins, L.F.

- Ferreira, Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, *Talanta*. 195 (2019) 327–332. doi:10.1016/j.talanta.2018.11.087.
- [36] N. Cennamo, L. Zeni, E. Ricca, R. Isticato, V.M. Marzullo, A. Capo, M. Staiano, S. D’Auria, A. Varriale, Detection of naphthalene in sea-water by a label-free plasmonic optical fiber biosensor, *Talanta*. 194 (2019) 289–297. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.051.
- [37] R.P. Talemi, S.M. Mousavi, H. Afruzi, Using gold nanostars modified pencil graphite electrode as a novel substrate for design a sensitive and selective Dopamine aptasensor, *Mater. Sci. Eng. C*. 73 (2017) 700–708. doi:10.1016/j.msec.2016.12.119.
- [38] A. Vasilescu, A. Hayat, S. Gáspár, J.L. Marty, Advantages of Carbon Nanomaterials in Electrochemical Aptasensors for Food Analysis, *Electroanalysis*. 30 (2018) 2–19. doi:10.1002/elan.201700578.
- [39] V.A. Spiridonova, T.M. Novikova, D.M. Nikulina, T.A. Shishkina, E. V. Golubkina, O.S. Dyukareva, N.N. Trizno, Complex formation with protamine prolongs the thrombin-inhibiting effect of DNA aptamer in vivo, *Biochimie*. 145 (2018) 158–162. doi:10.1016/j.biochi.2017.09.010.
- [40] G. Aydoğdu Tığ, D. Koyuncu Zeybek, B. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, Interaction of prednisone with dsDNA at silver nanoparticles/poly(glyoxal-bis(2-hydroxyanil))/dsDNA modified electrode and its analytical application, *Bioelectrochemistry*. 126 (2019) 56–63. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.11.003.
- [41] Y. Nakabayashi, M. Wakuda, H. Imai, Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer, *Anal. Sci*. 14 (1998)

1069–1076. doi:10.1109/CMSP.2011.155.

- [42] A. Amine, J.M. Kauffhann, G.G. Guilbault, S. Bacha, Characterization of Mixed Enzyme-Mediator-Carbon Paste Electrodes, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1281–1299. doi:10.1080/00032719308017413.
- [43] Y. Wang, Y. Zhu, J. Chen, Y. Zeng, Amperometric biosensor based on 3D ordered freestanding porous Pt nanowire array electrode, *Nanoscale.* 4 (2012) 6025. doi:10.1039/c2nr31256e.
- [44] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science.* 249 (1990) 505–510.
- [45] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands., *Nature.* 346 (1990) 818–822. doi:10.1016/0021-9797(80)90501-9.
- [46] T. Hianik, J. Wang, Electrochemical aptasensors - recent achievements and perspectives, *Electroanalysis.* 21 (2009) 1223–1235. doi:10.1002/elan.200904566.
- [47] K. Han, T. Liu, Y. Wang, P. Miao, Electrochemical aptasensors for detection of small molecules, macromolecules, and cells, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 201–211. doi:10.1515/revac-2016-0009.
- [48] S. Hyun Seok, T.H. Park, Integration of biomolecules and nanomaterials: Towards highly selective and sensitive biosensors, *Biotechnol. J.* 6 (2011) 1310–1316. doi:10.1002/biot.201100006.
- [49] E. Torres-Chavolla, E.C. Alocilja, Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3175–3182. doi:10.1016/j.bios.2008.11.010.
- [50] M.N. Velasco-Garcia, S. Missailidis, New trends in aptamer-based

- electrochemical biosensors, Review Article, *Gene Ther Mol Biol.* 13 (2009) 1–10.
- [51] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Homogeneous assays using aptamers., *Analyst.* 136 (2011) 257–274. doi:10.1039/c0an00281j.
- [52] G.T. Rozenblum, V.G. Lopez, A.D. Vitullo, M. Radrizzani, Aptamers: current challenges and future prospects, *Expert Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 127–135. doi:10.1517/17460441.2016.1126244.
- [53] G. Wang, Y. Wang, L. Chen, J. Choo, Nanomaterial-assisted aptamers for optical sensing, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1859–1868. doi:10.1016/j.bios.2009.11.012.
- [54] M. Liu, X. Yu, Z. Chen, T. Yang, D. Yang, Q. Liu, K. Du, B. Li, Z. Wang, S. Li, Y. Deng, N. He, Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy, *J. Nanobiotechnology.* 15 (2017) 1–16. doi:10.1186/s12951-017-0311-4.
- [55] M. Saberian-Borujeni, M. Johari-Ahar, H. Hamzeiy, J. Barar, Y. Omid, Nanoscaled aptasensors for multi-analyte sensing, *Bioimpacts.* 4 (2014) 205–215. doi:10.15171/bi.2014.015.
- [56] I. Willner, M. Zayats, Electronic aptamer-based sensors, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 6408–6418. doi:10.1002/anie.200604524.
- [57] A. Benvidi, M. Banaei, M.D. Tezerjani, H. Molahosseini, S. Jahanbani, Impedimetric PSA aptasensor based on the use of a glassy carbon electrode modified with titanium oxide nanoparticles and silk fibroin nanofibers, *Mikrochim Acta.* 185 (2017) 50. doi:10.1007/s00604-017-2589-1.
- [58] A. Shafaat, F. Faridbod, M.R. Ganjali, Label-free detection of cytochrome: C by a conducting polymer-based impedimetric screen-printed aptasensor, *New J. Chem.* 42 (2018) 6034–6039. doi:10.1039/c7nj03844e.

-
- [59] J. Shen, H. Wang, C. Li, Y. Zhao, X. Yu, X. Luo, Label-free electrochemical aptasensor for adenosine detection based on cascade signal amplification strategy, *Biosens. Bioelectron.* 90 (2017) 356–362. doi:10.1016/j.bios.2016.12.009.
- [60] K. Muzyka, M. Saqib, Z. Liu, W. Zhang, G. Xu, Progress and challenges in electrochemiluminescent aptasensors, *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 241–258. doi:10.1016/j.bios.2017.01.015.
- [61] V.T. Nguyen, Y.S. Kwon, M.B. Gu, Aptamer-based environmental biosensors for small molecule contaminants, *Curr. Opin. Biotechnol.* 45 (2017) 15–23. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.020.
- [62] Z. Chen, B. Mai, H. Tan, X. Chen, Nucleic Acid Based Nanocomposites and Their Applications in Biomedicine, *Compos. Commun.* 10 (2018) 194–204. doi:10.1016/j.coco.2018.10.003.
- [63] Y. Ahmadyousefi, S. Malih, Y. Mirzaee, M. Saidijam, Nucleic acid aptamers in diagnosis of colorectal cancer, *Biochimie.* 156 (2019) 1–11. doi:10.1016/j.biochi.2018.09.009.
- [64] Y. Zhou, W. Li, Y. Tseng, J. Zhang, J. Liu, Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma, *Talanta.* 194 (2019) 422–429. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.014.
- [65] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 537–550. doi:10.1038/nrd3141.
- [66] J. He, J. Wang, N. Zhang, L. Shen, L. Wang, X. Xiao, Y. Wang, T. Bing, X. Liu, S. Li, D. Shangguan, In vitro Selection of DNA Aptamers Recognizing Drug-resistant Ovarian Cancer by cell-SELEX, *Talanta.* 194 (2018) 437–445. doi:10.1016/J.TALANTA.2018.10.028.
- [67] M. Soldevilla, D. Meraviglia-Crivelli de Caso, A. Menon, F. Pastor, Aptamer-

- iRNAs as Therapeutics for Cancer Treatment, *Pharmaceuticals*. 11 (2018) 108. doi:10.3390/ph11040108.
- [68] A.L. Buddolla, S. Kim, Recent insights into the development of nucleic acid-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 172 (2018) 315–322. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.057.
- [69] F. Su, Q. Jia, Z. Li, M. Wang, L. He, D. Peng, Y. Song, Z. Zhang, S. Fang, Aptamer-templated silver nanoclusters embedded in zirconium metal–organic framework for targeted antitumor drug delivery, *Microporous Mesoporous Mater.* 275 (2019) 152–162. doi:10.1016/j.micromeso.2018.08.026.
- [70] D.K. Prusty, V. Adam, R.M. Zadegan, S. Irsen, M. Famulok, Supramolecular aptamer nano-constructs for receptor-mediated targeting and light-triggered release of chemotherapeutics into cancer cells, *Nat. Commun.* 9:535 (2018) 1-14. doi:10.1038/s41467-018-02929-2.
- [71] D. Bellido-Milla, L.M. Cubillana-Aguilera, M. El Kaoutit, M.P. Hernández-Artiga, J.L. Hidalgo-Hidalgo De Cisneros, I. Naranjo-Rodríguez, J.M. Palacios-Santander, Recent advances in graphite powder-based electrodes, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3525–3539. doi:10.1007/s00216-013-6816-2.
- [72] A.J. Clancy, M.K. Bayazit, S.A. Hodge, N.T. Skipper, C.A. Howard, M.S.P. Shaffer, Charged Carbon Nanomaterials: Redox Chemistries of Fullerenes, Carbon Nanotubes, and Graphenes, *Chem. Rev.* 118 (2018) 7363–7408. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00128.
- [73] R. Feng, W. Lei, X. Sui, X. Liu, X. Qi, K. Tang, G. Liu, M. Liu, Anchoring black phosphorus quantum dots on molybdenum disulfide nanosheets: a 0D/2D nanohybrid with enhanced visible–and NIR –light photoactivity, *Appl. Catal. B Environ.* 238 (2018) 444–453. doi:10.1016/j.apcatb.2018.07.052.
- [74] M. Alagiri, P. Rameshkumar, A. Pandikumar, Gold nanorod-based

electrochemical sensing of small biomolecules: A review, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 3069–3092. doi:10.1007/s00604-017-2418-6.

- [75] N.S. Ramgir, Y. Yang, M. Zacharias, Nanowire-based sensors, *Small.* 6 (2010) 1705–1722. doi:10.1002/sml.201000972.
- [76] M. García, P. Batalla, A. Escarpa, Metallic and polymeric nanowires for electrochemical sensing and biosensing, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 6–22. doi:10.1016/j.trac.2014.01.004.
- [77] Y. Xia, P. Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Mayers, One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications, *Adv. Mater.* 15 (2003) 353–389. doi:10.1002/adma.200390087.
- [78] Q. Wang, X. Zhang, L. Huang, Z. Zhang, S. Dong, One-Pot Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticle Loaded 3D Porous Graphene Nanocomposites with Enhanced Nanozyme Activity for Glucose Detection, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 7465–7471. doi:10.1021/acsami.6b16034.
- [79] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications, *Biosens. Bioelectron.* 103 (2018) 113–129. doi:10.1016/j.bios.2017.12.031.
- [80] Y. Chen, S. Zhou, L. Li, J. jie Zhu, Nanomaterials-based sensitive electrochemiluminescence biosensing, *Nano Today.* 12 (2017) 98–115. doi:10.1016/j.nantod.2016.12.013.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Capítulo 2

En este trabajo de tesis se han empleado distintas metodologías experimentales para la caracterización de los nanomateriales sintetizados, así como para la optimización de los sistemas estudiados. A continuación se presenta una breve descripción de los fundamentos teóricos y las aplicaciones de tales metodologías.

2.1. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas son aquellas que pueden emplearse para el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfaz entre un conductor electrónico (denominado electrodo) y un conductor iónico (al que se denomina electrolito soporte). Los procesos de reacción electrodo/conductor iónico son generados por una perturbación externa aplicada, y como consecuencia de ella ocurre una transferencia de electrones en dicha interfaz [1]. La magnitud de la respuesta electroquímica dependerá de la perturbación y del tiempo en la que ésta se mantiene. De acuerdo al tipo de perturbación que aplicada será el tipo de respuesta que se manifestará, y de ella va a depender la información obtenida. Si se aplica una diferencia de potencial se obtendrá una corriente; en cambio, si se aplica una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfaz electrodo-electrolito soporte.

Las técnicas utilizadas en este trabajo de tesis pueden clasificarse en:

- ✓ Técnica de barrido de potencial: voltamperometría cíclica.
- ✓ Técnicas de potencial controlado: amperometría y voltamperometría hidrodinámica.

-
- ✓ Técnica de perturbación periódica: Espectroscopia de impedancia electroquímica.

2.1.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es una de las técnicas más utilizadas y a menudo es el primer experimento a realizar en un estudio electroquímico para adquirir información cualitativa acerca de un sistema redox desconocido. Además, es utilizada para dilucidar mecanismos de reacción o realizar análisis cuantitativos. Esta técnica proporciona información rápida acerca de la termodinámica de los procesos redox, la cinética de transferencia de carga, así como sobre la existencia de reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción [1,2].

2.1.1-A. Respuesta de especies en solución

La VC una técnica potenciodinámica en la que se aplica una perturbación lineal triangular de potencial en función del tiempo. Se aplica un potencial inicial (E_i) hasta un potencial de corte (E_c) y luego se revierte el barrido hasta un potencial final (E_f), que puede ser igual o diferente a E_i . De esta manera, el potencial del electrodo de trabajo varía linealmente, a una velocidad constante (v , velocidad de barrido), que es la pendiente de la curva E vs t . El programa de potencial en función del tiempo para voltamperometría cíclica se encuentra esquematizado en la **Figura 2-1.A**. Como respuesta a dicha perturbación se produce una corriente que corresponde a la especie electroactiva que se encuentra en solución. La corriente se registra en función del potencial aplicado y dicho registro se denomina voltamperograma cíclico. En la **Figura 2-1.B** se ilustra el voltamperograma cíclico para un proceso reversible, donde se asume que sólo la especie reducida (R) está presente inicialmente en solución. Entonces ocurrirá la siguiente reacción:

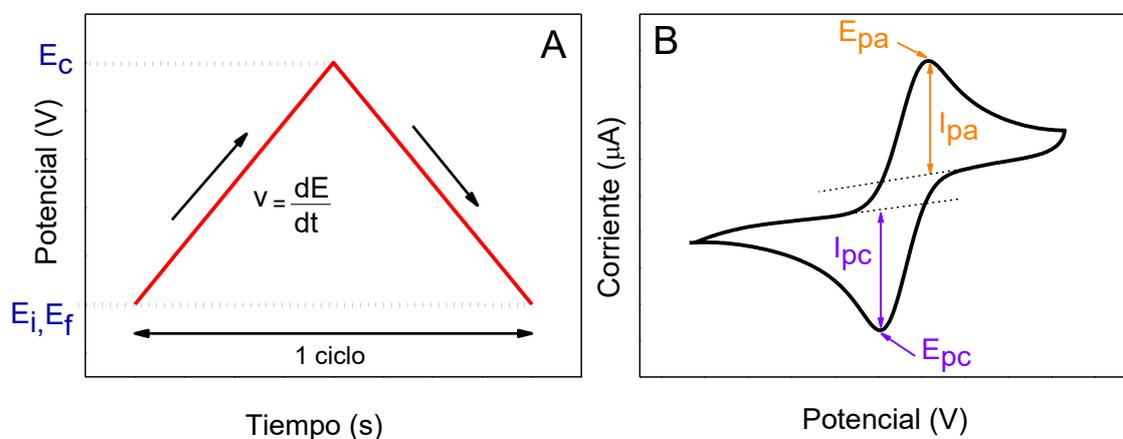
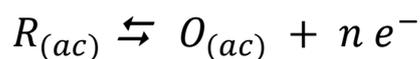


Figura 2-1. A. Perturbación de potencial aplicada en voltamperometría cíclica. B. Voltamperograma cíclico resultante.

Para un sistema que sólo contiene R, a un potencial E_i menor al potencial estándar de la cupla redox (E°), la corriente que se registra es corriente capacitiva, es decir, la corriente es sólo debido al cargado de la doble capa eléctrica. A medida que el potencial aplicado se aproxima al E° , ocurre la oxidación de la especie R, generándose O (especie oxidada), y provocando un aumento en el gradiente de concentración y por lo tanto, un incremento en la corriente faradaica. Ésta incrementa hasta llegar a un valor máximo, el cual recibe el nombre de corriente de pico anódico (I_{pa}), mientras que el potencial al cual se alcanza el máximo de corriente se denomina potencial de pico anódico (E_{pa}). A ese valor de potencial el gradiente de concentración es máximo, dado que la velocidad de oxidación es máxima. Bajo estas condiciones la concentración de R disminuye a cero en la superficie del electrodo. Luego, cuando el potencial es mayor al E_{pa} , se formará la especie O cuando R difunda desde el seno de la solución, lo cual lleva a un incremento de la capa difusional, y consecuentemente, ocurre una disminución del gradiente de concentración, provocando la caída de corriente típicamente observada en los voltamperogramas después del potencial de pico. La

concentración de la especie electroactiva disminuye sobre la superficie del electrodo, de acuerdo a la Ecuación de Nernst (**ecuación 2-1**):

$$E = E^{\circ} + \frac{2.303 RT}{nF} + \log \frac{C_O(0,t)}{C_R(0,t)} \quad \text{Ec. 2-1.}$$

donde E es el potencial del electrodo, E° el potencial formal de la cupla redox, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, n es el número de electrones intercambiados en la reacción, F es la constante de Faraday, C_O(0,t) y C_R(0,t) son las concentraciones de la especie oxidada y reducida en la superficie a un tiempo t, respectivamente.

La expresión para calcular la corriente obtenida se muestra en la **ecuación 2-2**. Aquí podemos ver que la corriente es proporcional al gradiente de concentración de la especie electroactiva (C_R) sobre la superficie del electrodo (x=0), a su coeficiente de difusión (D_R), el área geométrica del electrodo (A) y al número de electrones intercambiados n [1].

$$I(t) = n F A D_R \left[\frac{\partial C_R(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad \text{Ec. 2-2.}$$

En estas condiciones, cuando la concentración de R disminuye a cero en x = 0, se obtiene un valor de corriente máximo [3]. Cuando la dirección del barrido se invierte y se alcanza el potencial adecuado, ocurre el proceso inverso donde la especie O se reduce a R. De esta manera, cuando se alcanza el valor de potencial de pico catódico (E_{pc}) se obtiene la corriente de pico catódico (I_{pc}). La ocurrencia de este proceso depende de la reversibilidad de la reacción electroquímica.

En resumen, a partir de los perfiles voltamperométricos pueden obtenerse los diferentes parámetros antes mencionados (I_{pa}, I_{pc}, E_{pa}, E_{pc}), así como la relación entre las corrientes de pico (I_{pa}/I_{pc}) y la diferencia entre los potenciales de pico (ΔE_p= E_{pa}- E_{pc}). Estos parámetros de diagnóstico permiten caracterizar el proceso

redox que ocurre sobre el electrodo como **reversible**, **cuasi-reversible** e **irreversible**, según los criterios desarrollados por Nicholson y Shain [4]. La reversibilidad electroquímica de los sistemas redox está determinada por la relación entre las velocidades de los procesos de transferencia de carga y masa [5].

En **sistemas reversibles** la velocidad de la reacción electroquímica es más rápida que la de transferencia de masa y la concentración de la especie en solución está siempre determinada por la ecuación de Nernst (**ecuación 2-2**). En este caso, los E_p catódico y anódico son independientes de la velocidad de barrido v y la separación entre ellos, ΔE_p exhibe un valor de 0,059 V/n (a 25 °C). Asimismo, se encuentra que para este tipo de procesos I_{pa}/I_{pc} se aproxima al valor unitario. En estos sistemas, donde la corriente está limitada por la difusión de la especie electroactiva en la capa difusional, se encuentra que la corriente de pico I_p (anódica o catódica) varía linealmente con $v^{1/2}$, según la ecuación de Randles-Sevcik (**ecuación 2-3**) [2,6]:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 2-3.}$$

En un sistema con comportamiento **irreversible**, la velocidad de transferencia de masa es mayor a la de transferencia de carga. Por lo tanto en estos sistemas, I_p es de menor intensidad que el valor correspondiente a un sistema reversible, E_p depende de v , y al invertir el barrido de potencial no se observa corriente catódica [5]. Si el proceso se encuentra controlado por difusión, la I_p se relaciona con la $v^{1/2}$ de forma lineal por medio de la siguiente ecuación [2,6]:

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 2-4.}$$

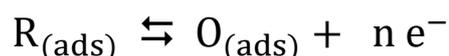
Los sistemas que presentan un comportamiento intermedio, se clasifican como **cuasi-reversibles**. En estos sistemas la corriente está controlada tanto por la

velocidad de transferencia de carga como por el transporte de masa. En el VC pueden observarse dos picos correspondientes a la oxidación y a la reducción, aunque la relación entre I_{pa}/I_{pc} es menor que la unidad. El valor de ΔE_p es mayor que 0,059 V por mol de electrones intercambiados y aumenta con la velocidad de barrido de potencial [2,6].

2.1.2-B. Respuesta de especies adsorbidas

La voltamperometría cíclica también puede ser utilizada para evaluar el comportamiento de especies que se encuentran adsorbidas sobre la superficie del electrodo. En este caso pueden despreciarse los efectos de transporte de masa y la forma del perfil voltamperométrico se modifica. De hecho, para un comportamiento ideal *nernstiano*, las especies confinadas en la superficie se manifiestan en el voltamperograma mediante picos simétricos, es decir $E_{pa} = E_{pc}$.

Si tenemos en cuenta la reacción:



que indica que sólo se oxida la especie R que se encuentra adsorbida, la corriente será directamente proporcional al cubrimiento superficial de R (Γ_R) y a la velocidad de barrido de potencial. Entonces, para un comportamiento reversible, el ΔE_p será igual a cero. Es importante remarcar que, el ancho de pico a la mitad de la corriente máxima ($E_{p1/2}$) alcanza un valor de 96 mV/n (a 25 °C) y la corriente de pico estará dada por la **ecuación 2.5** [2].

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{R T} A \Gamma_R v \quad \text{Ec. 2-5.}$$

El área bajo el pico anódico, es decir, la cantidad de carga consumida (Q_{ads}) durante la oxidación de R_{ads} se puede utilizar para calcular Γ_R , según la **ecuación 2-6**.

$$Q_{ads} = n F A \Gamma_R \quad \text{Ec. 2-6.}$$

Esta relación se puede emplear para calcular el área ocupada por la molécula adsorbida y, por lo tanto, para predecir su orientación en la superficie [2].

2.1.2. Amperometría

La amperometría es una técnica que se basa en la medición de la corriente originada como consecuencia de aplicar un escalón de potencial al electrodo de trabajo, el cual se encuentra inmerso en una solución bajo convección forzada. Este proceso asegura el aporte continuo del analito hacia la superficie del electrodo, por lo que cuando se produce la oxidación o reducción del mismo, se alcanza una corriente de estado estacionario (I_{ee}). De esta manera, sobre la superficie del electrodo se establece una capa difusional (δ) cuyo espesor es constante y depende de la velocidad de agitación y viscosidad de la solución. En estas condiciones, la corriente es controlada por la difusión del analito en la capa difusional, y su valor I_{ee} está definido por la **ecuación 2-7**.

$$I_{ee} = \frac{n F A C_R D_R}{\delta} \quad \text{Ec. 2-7.}$$

donde n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, D_R y C_R son el coeficiente de difusión y la concentración de la especie

electroactiva en el seno de la solución, respectivamente, y δ es el espesor de la capa difusional.

En esta técnica, la perturbación consiste en la aplicación de un potencial desde un valor en el que no ocurre la reacción faradaica (E_1), generalmente el potencial de circuito abierto, a un valor de potencial (E_2) donde la especie es oxidada o reducida y como consecuencia se produce una corriente la cual es registrada en función del tiempo (**Figura 2-2.A**).

Desde el punto de vista analítico, la amperometría se puede aplicar a la cuantificación de compuestos [5]. Por consiguiente, el agregado del analito a la celda produce un aumento en la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo y el consecuente incremento de i_{ee} , como ilustra la **Figura 2-2.B**. La determinación de i_{ee} en función del tiempo se conoce como registro amperométrico y permite conocer la concentración del analito en una solución problema y la sensibilidad con que el mismo es detectado [2], la cual se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración.

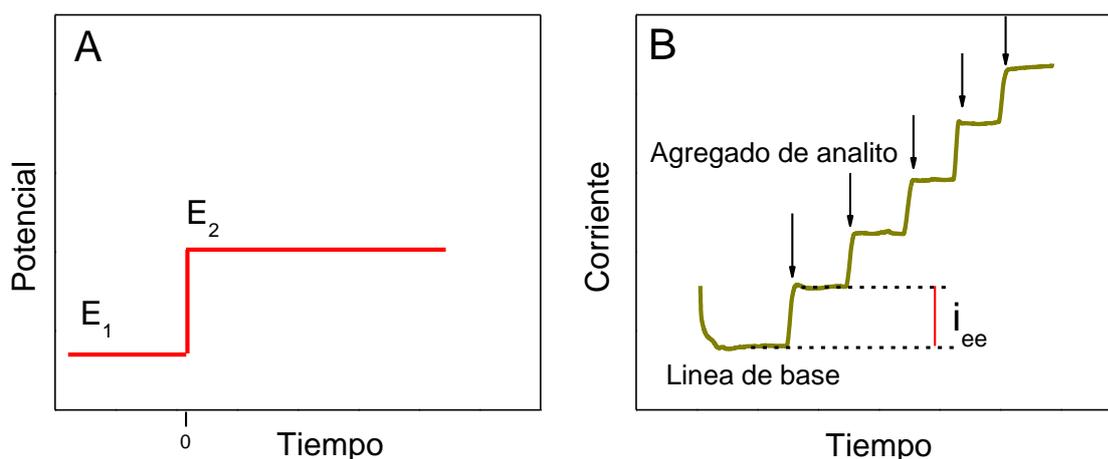


Figura 2-2. A. Perturbación de potencial aplicada en amperometría. B. Registro amperométrico con convección forzada para sucesivos agregados de compuesto electroactivo.

2.1.3. Voltamperometría hidrodinámica

La voltamperometría hidrodinámica (VH) puede considerarse una extensión de la amperometría. Esta técnica consiste en la determinación de la corriente límite producida por la reacción electroquímica del analito agregado en condiciones de convección forzada, aplicando diferentes valores de potencial punto por punto [1]. Consecuentemente, se obtienen registros de corriente vs potencial aplicado como se muestra en la **Figura 2-3**.

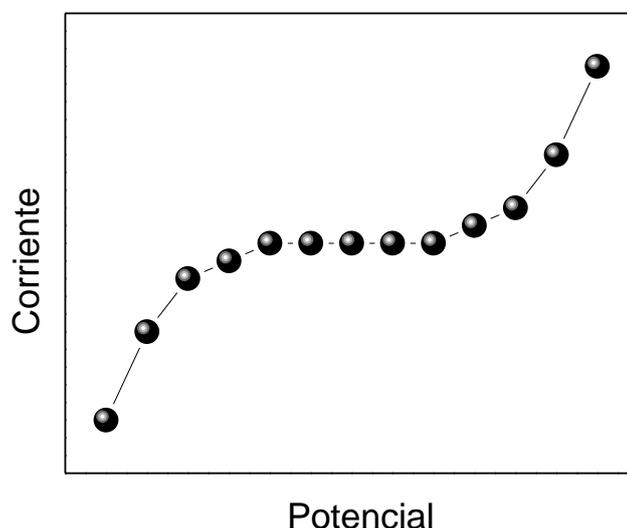


Figura 2-3. Esquema de un voltamperograma hidrodinámico obtenido registrando las corrientes en función de los diferentes potenciales aplicados punto por punto, en condición de convección forzada.

Esta técnica permite conocer el comportamiento electroquímico de la especie en estudio sobre la superficie del electrodo, y además se utiliza para seleccionar el potencial de trabajo más conveniente para realizar posteriores determinaciones amperométricas. Esta es una metodología más precisa que la voltamperometría cíclica, ya que se alcanzan valores superiores de corriente límite que en ausencia de la convección forzada, con gran sensibilidad y reproducibilidad.

2.1.4. Espectroscopia de impedancia electroquímica

Como se mencionó anteriormente, la voltamperometría cíclica se basa en la aplicación de perturbaciones de potencial de gran amplitud, lo cual conduce al electrodo a un estado alejado del equilibrio, observándose como respuesta una señal transitoria de corriente. Por el contrario, la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE), es una técnica que se basa en aplicar una perturbación periódica de pequeña amplitud, potencial o corriente, de manera que la respuesta observada corresponde al sistema en estado estacionario. Esta es una técnica no destructiva que permite caracterizar las propiedades eléctricas de materiales e interfaces [3,5,7] y consiste en la determinación de la impedancia (Z) que presenta un sistema electroquímico a diferentes frecuencias. La impedancia eléctrica mide la oposición de un circuito o de un componente eléctrico al paso de una corriente eléctrica sinusoidal alterna [1,8].

Generalmente la perturbación aplicada es un potencial sinusoidal (E_{ac}) de muy pequeña amplitud (unos pocos mV), con una determinada frecuencia angular (ω). Dicha perturbación se expresa matemáticamente como:

$$E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ec. 2-8.}$$

En donde $E(t)$ es el valor instantáneo del potencial, E_{ac} es la amplitud máxima y ω es la frecuencia angular, que se relaciona con la frecuencia en radianes f de acuerdo a: $\omega = 2\pi f$.

Por lo tanto, la corriente asociada ($i(t)$) a una señal de potencial sinusoidal, es también sinusoidal, de la misma frecuencia (ω) pero de amplitud diferente y desfasada por un ángulo φ . Esto puede ser representado de acuerdo a la siguiente expresión:

$$i(t) = I_{ac} \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad \text{Ec. 2-9.}$$

donde I_{ac} es la amplitud de corriente correspondiente al estado estacionario.

En la **Figura 2-4** se esquematiza la perturbación y la respuesta asociada a la misma.

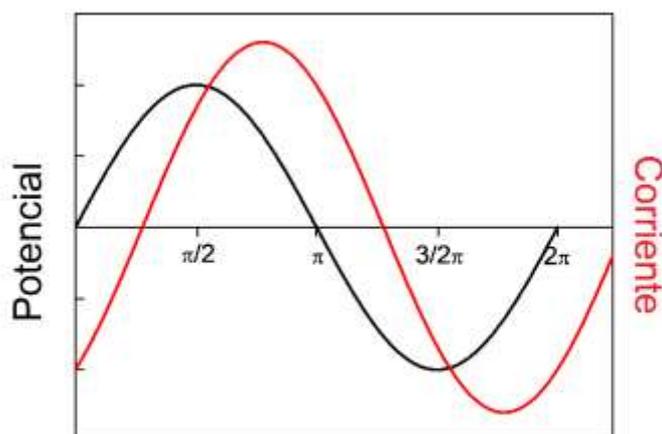


Figura 2-4. Representación de la perturbación de potencial (—) y su respuesta en corriente (—) desfasada por un determinado ángulo de fase en espectroscopia de impedancia electroquímica.

El cociente entre las dos señales periódicas se denomina impedancia:

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{i(\omega)}$$

La impedancia, además, se puede expresar como un número complejo:

$$Z = |Z_0| (\cos \varphi + j \operatorname{sen} \varphi) = Z' + j Z'' \quad \text{Ec. 2-10.}$$

donde $|Z_0|$ es la magnitud, φ es el ángulo de fase, j es el número imaginario $\sqrt{-1}$, Z' es la parte real, y Z'' la parte imaginaria de la impedancia. La componente real está asociada con el comportamiento resistivo y la componente imaginaria con el capacitivo [9].

Entre las diferentes representaciones gráficas de los datos impedimétricos, como todo número complejo, la impedancia Z puede representarse en coordenadas rectangulares o en coordenadas polares. La representación en el plano complejo (Z'' vs. Z') se conoce como diagrama de Nyquist. En esta gráfica cada punto corresponde a una frecuencia diferente. Por otra parte, en coordenadas polares, los datos se pueden representar como $\log |Z|$ y el ángulo de fase φ vs. $\log(\omega)$, conocidos como representación de Bode. [7].

Existen dos posibles métodos de interpretación de la respuesta de impedancia de un sistema. El primero y más comúnmente utilizado implica la combinación de elementos de circuitos eléctricos, llamados circuitos equivalentes, mediante el uso de elementos pasivos como condensadores, resistencias e inductancias. Para cada caso se debe encontrar un circuito que ajuste la respuesta de impedancia con el dato experimental. El segundo método, más riguroso, implica establecer y resolver las ecuaciones diferenciales correspondientes a todos los procesos que ocurren en el sistema. Esta metodología de interpretación es poco utilizada ya que su implementación requiere conocer las condiciones iniciales y las características del sistema, e identificar los procesos que ocurren para la resolución de las ecuaciones diferenciales [8,10].

En este trabajo, para la interpretación de los resultados obtenidos se utilizó el análisis de espectros de impedancia a través de circuitos eléctricos equivalentes.

2.1.4-A. Circuitos eléctricos equivalentes

Como se mencionó anteriormente, es posible representar una celda electroquímica combinando elementos eléctricos simples como resistencias y capacitores. A partir de los diagramas Nyquist y Bode, y su correspondiente análisis mediante el diseño de circuitos eléctricos apropiados, los datos experimentales obtenidos pueden ser ajustados con curvas teóricas, lo que permite obtener los

parámetros que definen el sistema en estudio, tales como la capacidad de la doble capa eléctrica (C_{dc}), la resistencia de la solución (R_s), la resistencia de transferencia de carga (R_{tc}) y la impedancia de Warburg (Z_w), entre otros.

La respuesta en corriente de una resistencia R a una señal periódica de potencial conduce a una impedancia que tiene sólo componente real, siendo el módulo de la impedancia también igual a R :

$$Z' = Z'' = R \quad \text{Ec. 2-11.}$$

En cambio, para un capacitor C la impedancia es función de la frecuencia:

$$Z_C = -j \frac{1}{\omega C} \quad \text{Ec. 2-12.}$$

El ángulo de fase que corresponde a una resistencia pura es de 0° y para un capacitor puro es de -90° .

Un circuito equivalente frecuentemente utilizado es el circuito simple $R(RC)$, en donde la reacción de transferencia de carga a través de la doble capa eléctrica de un conductor en contacto con un electrolito, se puede representar mediante el circuito equivalente mostrado en la **Figura 2-5.A**, donde C_{dc} representa la capacidad de la doble capa, R_s resistencia de la solución entre el electrodo de trabajo y referencia y R_{tc} la resistencia de transferencia de carga en la interfaz [10]. La **Figura 2-5.B** permite observar que $\log |Z|$ es constante a valores extremos de frecuencia, igual a la suma de las resistencias ($R_s + R_{tc}$) en el límite de frecuencias muy bajas e igual a R_s en el límite de frecuencias altas. En el intervalo de frecuencias intermedias el comportamiento es capacitivo y $\log |Z|$ varía linealmente con $\log |w|$ con una pendiente igual a -1 .

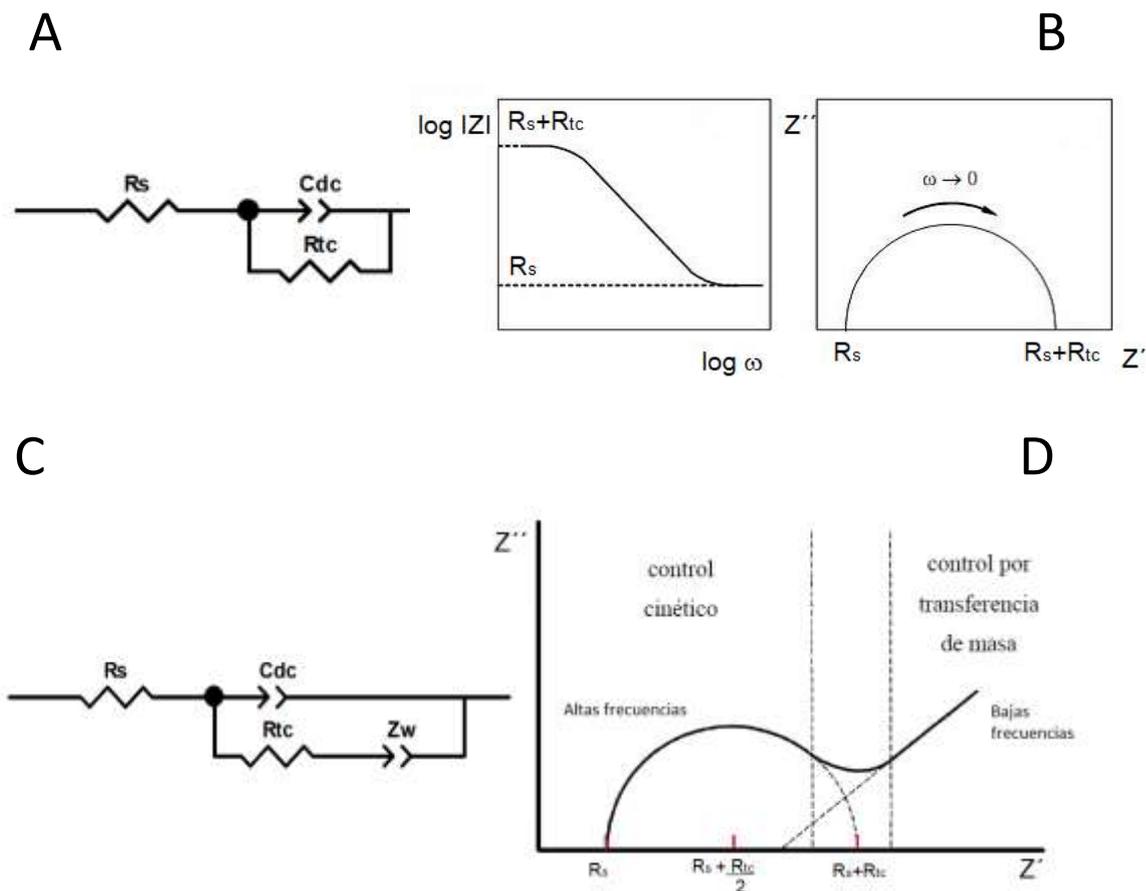


Figura 2-5. A. Circuito equivalente R(RC) para un electrodo en contacto con un electrolito. **B.** Gráficos de Bode y de Nyquist correspondientes al circuito R(RC) **C.** Circuito equivalente de Randles para la transferencia de carga y la difusión de una especie redox. **D.** Gráfico de Nyquist correspondiente al circuito de Randles.

Otro circuito ampliamente utilizado es el circuito de Randles (**Figura 2-5.C**) [6,9], el cual consiste en una R_s y la C_{dc} en paralelo con una R_{tc} y con la impedancia de Warburg (Z_w). En este caso, en el diagrama de Nyquist pueden observarse dos procesos bien diferenciados, como se ilustra en la **Figura 2-5.C**. Por un lado, a frecuencias altas e intermedias se puede observar un semicírculo, relacionado con el proceso de transferencia de carga, del cual se puede obtener el valor de R_s y R_{tc} . Por otra parte, a frecuencias bajas predomina el control difusional, es decir por transferencia de masa (representada con la Z_w) y en consecuencia en el diagrama de Nyquist podemos ver una línea recta con un valor de pendiente igual a $-1/2$ con un ϕ de 45° [11].

En la **Figura 2-6.A** se muestra un circuito equivalente que se corresponde con un modelo utilizado para ajustar los datos obtenidos con electrodos recubiertos con películas que poseen poros en la superficie. En este modelo se considera que existen dos zonas de la superficie con distintas resistencias a la transferencia de carga (R_1 y R_2), es decir la velocidad con la que la sonda redox se descarga sobre ambas zonas, es diferente. Si estas velocidades son muy similares, los semicírculos se solapan y en el diagrama de Nyquist (**Figura 2-6.B**) se observará un solo semicírculo. Dependiendo del sistema, se puede observar o no el componente difusional (Z_w).

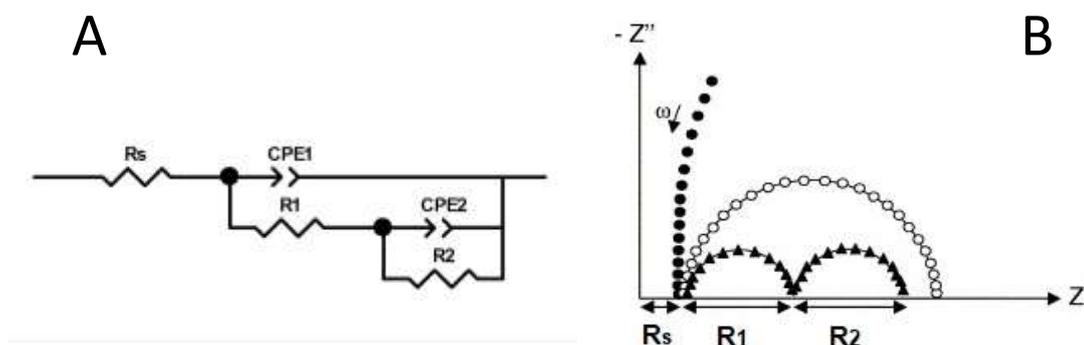


Figura 2-6. A Circuito equivalente para un electrodo recubierto que presenta poros. **B.** Gráfico de Nyquist correspondiente al circuito mostrado en **A**.

2.1.2. Equipamiento electroquímico

Las mediciones amperométricas fueron llevadas a cabo en las estaciones de trabajo TEQ_02, TEQ_04 y Epsilon Workstation (BAS) y para experimentos de VC se utilizaron los potenciostatos PGSTAT128N y PGSTAT101 (Autolab), mientras que los espectros de impedancia fueron adquiridos mediante el módulo FRA32M del potenciostato PGSTAT128N. Los datos de EIE fueron ajustados y modelados con el software ZView2.

2.2. Microscopías

2.2.1. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) proporciona información sobre la morfología y topografía de la superficie de una muestra, mediante el barrido con un haz de electrones acelerados por aplicación de alto voltaje. En adición, el análisis de rayos X proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre la composición elemental de las diversas áreas de la superficie. En SEM se trabaja siempre en condiciones de vacío para que la trayectoria de los electrones no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas que no sean de la muestra a analizar.

De todas las formas de radiación resultantes de la interacción del haz incidente y la muestra, hay dos realmente fundamentales en microscopia de barrido: los electrones secundarios (ES) y los electrones retrodispersados (ER) (**Figura 2-7**) [12].

La señal de ES es la que se emplea habitualmente para obtener una imagen de una muestra. Éstos son electrones de baja energía (de menos de 50 eV) y resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra más cercanos a la superficie. Por lo tanto, proporcionan una imagen de la morfología superficial de la muestra. Los ER poseen mayor energía que los ES y por esta razón aportan información acerca de regiones más profundas de la muestra, de manera que son sensibles a la composición de la misma. La intensidad de la señal de ER, para una energía dada del haz, depende del número atómico (Z) del material, siendo mayor para Z mayores. Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. De esta manera, las áreas con elementos con mayor Z aparecen más brillantes en la imagen [12,13].

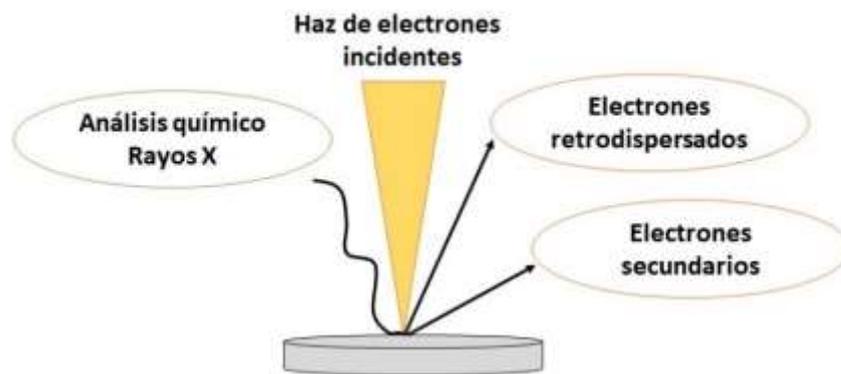


Figura 2-7. Representación de la interacción del haz incidente con la muestra y emisiones de electrones en SEM.

Esta técnica se utilizó para caracterizar los nanomateriales sintetizados. Las imágenes SEM mostradas en este trabajo de tesis fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido FE-SEM Sigma de Carl Zeiss con un detector de energía dispersiva de Oxford (EDS) (LAMARX-IFEG).

2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*) es una de las herramientas más poderosas en la caracterización de sistemas de escala nanométrica. Es una técnica en la cual una muestra de poco espesor es irradiada por un haz de electrones acelerados por un alto voltaje (100-400 KV). Esta técnica permite estudiar la morfología de la muestra, su estructura cristalina y su composición con gran precisión.

En general, la imagen estará asociada a la intensidad del haz de electrones transmitidos a través de la muestra. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones

directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro) (Figura 2-8.) [14,15].

Esta técnica se utilizó en la caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas. Las muestras se prepararon en una rejilla de cobre recubierta de Formvar/Carbon. Las imágenes TEM se realizaron con el microscopio JEM-JEOL EX II 1200. (CIAP-INTA). Las imágenes TEM y HRTEM se obtuvieron mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión Philips CM200UT, en modo normal y en modo de alta resolución (CNEA- CAB).

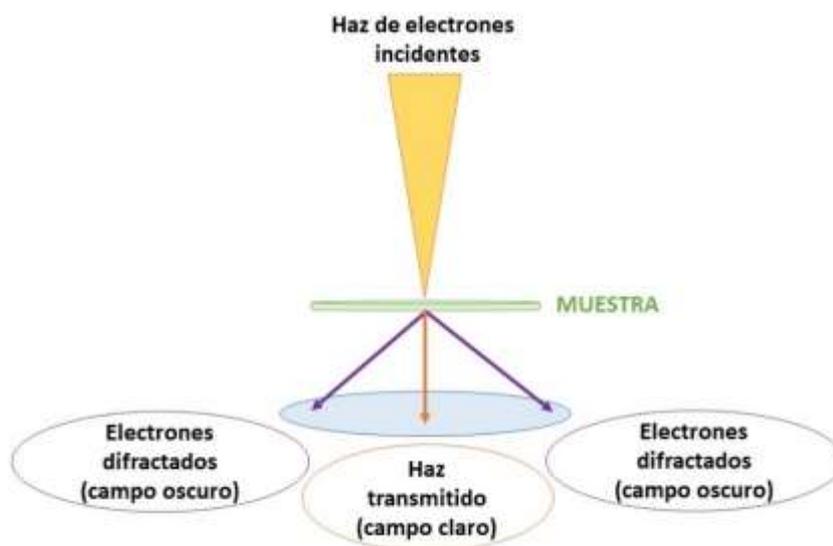


Figura 2-8. Representación de la interacción del haz incidente con la muestra delgada y formación de imagen en TEM.

2.3. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis es una técnica es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de nanopartículas metálicas. Debido a que, cuando las nanopartículas se encuentran bajo la influencia de un campo electromagnético presentan una banda de absorción característica relacionada

con la resonancia del plasmón superficial (oscilación de los electrones libres del metal). Por lo tanto, mediante esta técnica se pueden hacer estimaciones acerca de la forma, el tamaño y la homogeneidad de las partículas dependiendo de la posición y la forma de las bandas de absorción [17,18]. En la **Figura 2-9** se presenta un espectro de absorción comparativo entre nanopartículas de oro de diferente forma y tamaño.

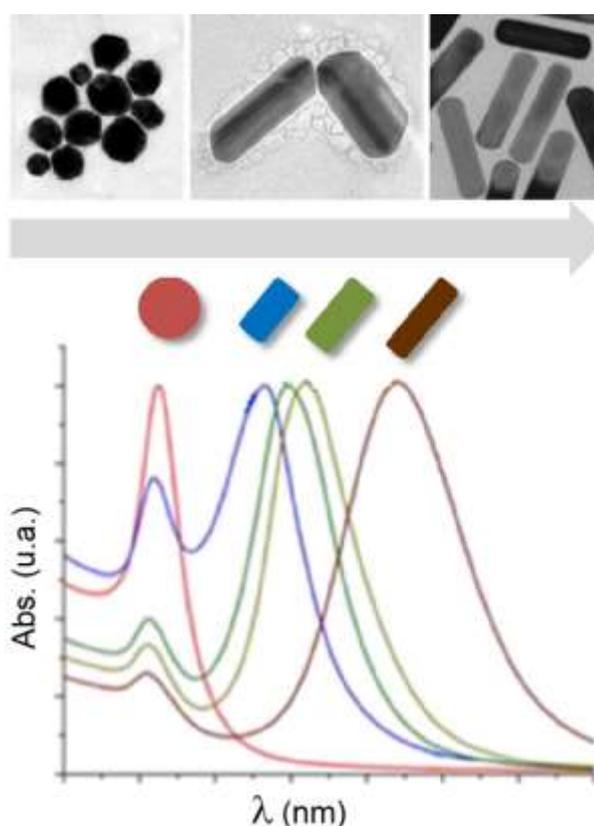


Figura 2-9. Absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de diferentes tamaños y formas. Imagen tomada de referencia [18].

Los espectros UV-Vis realizados en este trabajo se registraron con un espectrómetro Shimadzu UV-1200 utilizando una celda de cuarzo de 0,100 cm a temperatura ambiente.

2.3. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica no destructiva cuya aplicación principal es la identificación de las fases presentes en una muestra cristalina. Además, permite estudiar las distancias entre planos y la obtención de parámetros de red, así como el tamaño de grano, orientación y calidad cristalina.

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz mono-energético de rayos X sobre los átomos de una red cristalina. Este proceso promueve la formación de una serie de haces difractados, cuyas intensidades y posiciones dependen de la estructura cristalina en particular. Este fenómeno se explica satisfactoriamente a través de la ley de Bragg (**ecuación 2-10**), en el cual la radiación incidente se refleja en los sucesivos planos (hkl , índices de Miller) de la red cristalina y de esta manera se determina la ubicación de los máximos en la intensidad difractada.

$$n \lambda = 2d_{hkl} \text{sen } \theta_{hkl} \quad \text{Ec. 2-13.}$$

donde n es un número entero y se lo conoce como orden de reflexión, λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d_{hkl} es la distancia entre la familia de planos (hkl) y θ_{hkl} es el ángulo formado entre la radiación incidente y la superficie de los planos. Por lo general, se encuentran numerosos cristales individuales de orientación aleatoria en la muestra, por lo que todas las posibles difracciones de Bragg generan un "patrón de difracción". Existe una base de datos que incluyen las separaciones interplanares para todos los picos de difracción observados, sus intensidades relativas y su índice de hkl para cada material conocido. Asimismo, esta base de datos se encuentra disponible para identificar, por comparación, los picos en un patrón de difracción experimental [14].

En este trabajo de tesis, los patrones de DRX fueron determinados con un difractómetro de polvo PANalytical X'Pert PRO (que funciona a 40 kV, 40 mA), en

geometría de reflexión Bragg-Brentano con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Los datos se obtuvieron en el rango de 2θ entre 8° y 120° , utilizando el detector PIXcel (INFIQC-UNC).

2.4. Celdas electroquímicas y electrodos

En los experimentos electroquímicos se utilizó una celda convencional de tres electrodos: el electrodo de trabajo, un electrodo de referencia de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3M (BAS), y como contraelectrodo o electrodo auxiliar un alambre de platino. Los mismos se colocaron en la celda electroquímica de vidrio, a través de los orificios de la tapa de Teflon®, como muestra la **Figura 2-10**. Para experimentos con convección forzada, se empleó un agitador y un buzo magnético.

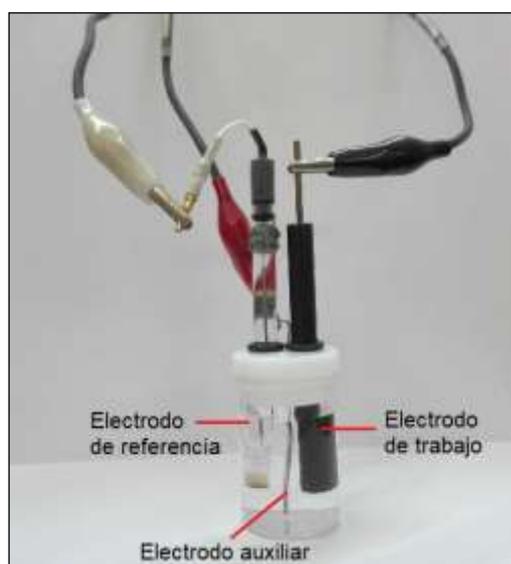


Figura 2-10. Celda electroquímica de trabajo con el sistema de tres electrodos.

Para la síntesis de los nanohilos se utilizó una celda de Teflon® diseñada especialmente con un orificio superior donde se colocan los electrodos de

referencia y contraelectrodo, y uno inferior en donde se coloca la membrana de óxido de aluminio anodizado (AAO), previamente metalizada para que sea conductora, ya que en este caso es utilizada como electrodo de trabajo para efectuar la deposición del metal en estudio en los poros (**Figura 2-11.**).



Figura 2-11. A. Celda electroquímica de síntesis de nanohilos. B. Vista posterior membrana Watman[®] metalizada.

Para los sensores y biosensores diseñados en este trabajo de Tesis se utilizaron electrodos de trabajo compósito de pasta de carbono (CPE) modificados con nanopartículas de magnetita y glucosa oxidasa o con nanoalambres de níquel y electrodos de oro policristalino que fueron modificados con nanopartículas anisotrópicas de oro y el aptámero anti-trombina humana.

2.4.1. Electrodos compósito de pasta de grafito

Un electrodo compósito puede definirse como un material que consta al menos de una fase conductora y una aislante. Los electrodos compósito ofrecen numerosas ventajas, por ejemplo, pueden fabricarse con una gran versatilidad en cuanto a la forma, tamaño y composición, permitiendo la incorporación de diversos materiales y biomoléculas. Las incorporaciones realizadas se utilizan para

una mejora en la sensibilidad y selectividad del electrodo, ofreciendo una fácil adaptación a una gran variedad de configuraciones electrónicas, las cuales permiten resolver diferentes tipos de problemas analíticos [19].

Los CPE presentan ventajas como el bajo costo, superficie renovable y la facilidad de modificación, las cuales se encuentran relacionadas con el proceso de fabricación [21]. Debido a que este proceso implica simplemente mezclar el grafito con materiales aglutinantes adecuados para formar una pasta, la modificación de este material ha dado lugar a varios tipos de innovaciones. Las más relevantes son la modificación de la pasta con polímeros, mediadores redox, nanomateriales y elementos de reconocimiento para construir sensores electroquímicos y biosensores [22].

En este trabajo de Tesis se utilizaron electrodos compósito de pasta de carbono fabricados a partir de micropartículas de grafito en polvo (fase conductora) y aceite mineral (fase aislante). A dicha matriz electrónica se le incorporaron nanopartículas de magnetita, glucosa oxidasa o nanohilos de níquel con el objetivo de desarrollar diferentes transductores según la aplicación analítica deseada.

Una vez obtenida la pasta de grafito resultante, el material fue empaquetado en un cuerpo cilíndrico de Teflon[®], utilizando como contacto eléctrico un tornillo metálico colocado en uno de los extremos del soporte hueco, como se muestra en la **Figura 2-12**.



Figura 2-12. Cilindro de Teflon® utilizado como soporte del material de electrodo compósito.

2.4.2. Electrodo de oro

Los electrodos de oro empleados en el presente trabajo de tesis fueron electrodos comerciales de Au policristalino de 2 mm de diámetro (CHI 101, CH Instruments). En la **Figura 2-13** se muestra una imagen de dicho electrodo.



Figura 2-13. Electrodo de oro policristalino (CH Instruments).

2.4.2-A. Limpieza y pretratamiento de electrodos de oro.

Los electrodos de oro policristalino son ampliamente utilizados en el desarrollo de biosensores debido a la facilidad con la que pueden ser modificados con un gran número de especies químicas o entidades biológicas a través de la derivatización de la superficie con moléculas tioladas [23,24].

Un factor importante a tener en cuenta cuando se utilizan electrodos de Au es la dependencia de la respuesta con las condiciones iniciales de la superficie del electrodo. De esta manera, para poder utilizar los electrodos de oro, es necesario realizar un pretratamiento exhaustivo con el objetivo de acondicionar la superficie. El protocolo de limpieza utilizado en el presente trabajo de tesis consistió en el siguiente procedimiento:

1. **Pulido químico**: los electrodos fueron colocados durante 10 minutos en una solución “piraña” (peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico en una proporción 30/70 V/V). La preparación de esta solución es un proceso exotérmico. Además esta solución es fuertemente oxidante y, por lo tanto, oxida los compuestos orgánicos que puedan encontrarse adsorbidos en la superficie del electrodo.
2. **Pulido mecánico**: los electrodos se pulieron hasta “apariencia espejo” en suspensiones acuosas de alúmina 1,0 y 0,3 μm , sucesivamente, sobre paño DP-Nap (Struers).
3. **Limpieza con ultrasonido**: posteriormente los electrodos fueron sometidos a sonicación por 10 segundos en agua ultrapura, con el objetivo de eliminar las micropartículas de alúmina que posiblemente hubiesen quedado incrustadas en la superficie del electrodo en el proceso de pulido mecánico.
4. **Tratamiento con solución “piraña”**: efectuado durante 1 minuto para remover impurezas de la superficie del electrodo.

5. Pulido electroquímico: se aplicó una secuencia de 8 etapas de oxidación/reducción en solución de H_2SO_4 0,50 M. Cada etapa corresponde a un pulso de 2,000 V durante 2 segundos (oxidación) y uno de $-1,000$ V durante 4 segundos (reducción). Luego se realizaron 30 ciclos sucesivos empleando voltamperometría cíclica, en la misma solución, entre $-0,100$ y $+1,600$ V a una velocidad de barrido de $2,000 \text{ V s}^{-1}$.

El estado superficial de los electrodos de Au se verificó realizando un voltamperograma cíclico en H_2SO_4 0,50 M a $0,100 \text{ V s}^{-1}$, como se muestra en la **Figura 2-14**.

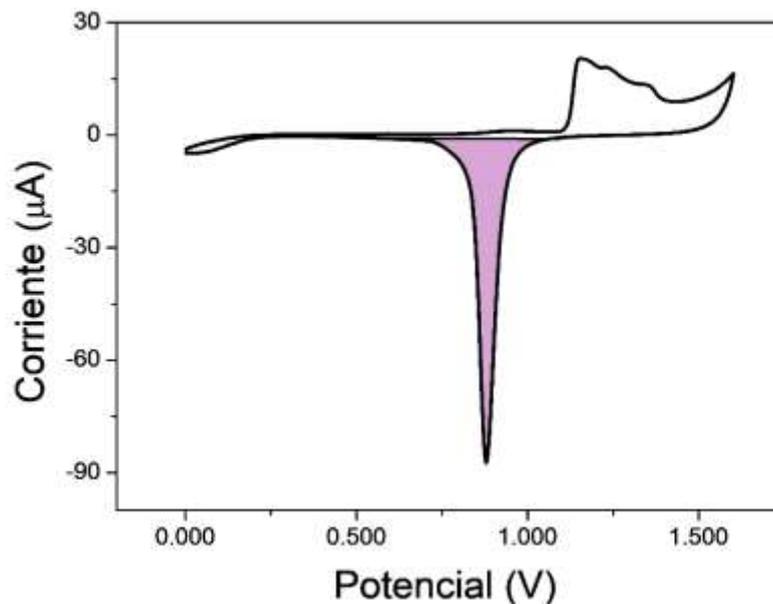


Figura 2-14. Voltamperograma cíclico sobre Au policristalino en una solución de H_2SO_4 0,50 M. La integral del área (coloreada) se corresponde con el valor de la carga debida a la reducción de los óxidos de Au. Velocidad de barrido: $0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Como se muestra en la **Figura 2-14** cuando se realiza el barrido anódico, desde un potencial de 0,000 V hasta 1,600 V, se observa solamente corriente capacitiva hasta un potencial de 1,100 V. A potenciales más positivos que 1,100 V se pueden apreciar los tres picos de corriente que corresponden a la formación de los óxidos de oro en las distintas caras cristalinas presentes en el electrodo [25]. Al

invertir el sentido del barrido se observa un pico catódico correspondiente a la reducción de los óxidos de Au formados previamente (sombreado en la **Figura 2-14**).

Para determinar el área electroactiva de los electrodos se integró el pico de reducción de los óxidos de oro. De esta manera la **ecuación 2-14** se puede utilizar para determinar la carga (Q_{Au}) involucrada en el proceso:

$$Q_{Au} = \frac{1}{\nu} \int_{E_1}^{E_2} i dE \quad \text{Ec. 2-14.}$$

donde E_1 y E_2 son los límites de potencial de la zona sombreada en la **Figura 2-14**. Una vez obtenida la carga, mediante la **ecuación 2-15**, finalmente se puede calcular el área electroactiva del electrodo.

$$A = \frac{Q_{Au}}{390 \mu C cm^{-2}} \quad \text{Ec. 2-15.}$$

donde $390 \mu C cm^{-2}$ es un factor que da cuenta de la carga necesaria para reducir una monocapa de Au formada sobre una superficie policristalina de $1 cm^2$ [26].

2.5. Bibliografía

- [1] A.J.B. and L.R. Faulkner, Electrochemical methods. Fundamentals and applications, 1993. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [2] J. Wang, Analytical electrochemistry - 3rd Edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [3] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, Electrochemistry: Principles, Methods, and

Applications, Oxford University Press, Oxford, 1993.

- [4] S.I. Nicholson Richard, Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems, Anal. Chem. 36 (1964) 706–723. doi:10.1177/096673690401300103.
- [5] H.H. Girault, Analytical and Physical Electrochemistry, EFPL Press, Lausana, 2004.
- [6] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Wiley, New York, 2001. doi:10.1023/A:1021637209564.
- [7] H.M. Villullas, E.A. Ticianelli, V.A. Macagno, E.R. González, Electroquímica fundamentos y aplicaciones en un enfoque interdisciplinario, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2000.
- [8] J.R. Macdonald, Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, Second Edition, Wiley-Interscience, New Jersey, 2005. doi:10.1016/j.snb.2007.02.003.
- [9] S. Krause, Impedance Methods, in: A.J. Bard, M. Stratmann, P.R. Unwin (Eds.), Encycl. Electrochem. Vol. 3, Instrum. Electroanal. Chem., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [10] M.E. Orazem, B. Tribollet, Electrochemical Impedance Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2008.
- [11] C. Fernández-Sánchez, C.J. McNeil, K. Rawson, Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 37–48. doi:10.1016/j.trac.2004.08.010.
- [12] C.E. Lyman, J.I. Goldstein, A.D. Romig, P. Echlin, D.C. Joy, D.E. Newbury, D.B. Williams, J.T. Armstrong, C.E. Fiori, E. Lifshin, K.-R. Peters, Scanning Electron

- Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy, Plenum Press, New York, 1990.
- [13] V. Sorrivias de Lozano, A. Morales, M.J. Yañez, Principios y práctica de la microscopía electrónica, 1ra. Edición, Argentina, 2014.
- [14] B. Fultz, J. Howe, Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials, Third Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [15] C.B.C. David B. Williams, Transmission electron microscopy: a textbook for materials science, Springer, 2009. doi:10.1007/978-1-61779-415-5_23.
- [16] S.R.C. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Edition, Thomson Brooks/Cole, 2013. doi:10.1021/ed048pA48.3.
- [17] L. Anghinolfi, Self-Organized Arrays of Gold Nanoparticles Morphology and Plasmonic Properties, Springer, 2013. doi:10.1007/978-3-642-35133-4.
- [18] M. Valcárcel, Á.I. López-Lorente, Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry, Elsevier, 2014. doi:10.1016/B978-0-444-63285-2.00005-5.
- [19] P.S.B. José. M. Pingarrón Carrazón, Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones. Editorial Síntesis, España (1999).
- [20] R.N. Adams, Carbon Paste Electrodes, Anal. Chem. 30 (1958) 1576–1576. doi:10.1002/9783527697489.ch11.
- [21] S.A. Wring, J.P. Hart, Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds A review, Analyst. 117 (1992) 1215–1229. doi:10.1039/AN9921701215.
- [22] I. Svancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytras, I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytras, Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes, 2012. doi:10.1080/01418610108214448.

-
- [23] C. Vericat, M.E. Vela, G. Corthey, E. Pensa, E. Cortes, M.H. Fonticelli, F. Ibanez, G.E. Benitez, P. Carro, R.C. Salvarezza, Self-assembled monolayers of thiolates on metals: a review article on sulfur-metal chemistry and surface structures, *RSC Adv.* 4 (2014) 27730–27754. doi:10.1039/c4ra04659e.
- [24] H. Hakkinen, The gold-sulfur interface at the nanoscale, *Nat. Chem.* 4 (2012) 443–455. doi:10.1038/NCHEM.1352.
- [25] A. Hamelin, Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407 (1996) 1–11. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-0728(95)04499-X.
- [26] R.F. Carvalho, R. Sanches Freire, L.T. Kubota, Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation, *Electroanalysis.* 17 (2005) 1251–1259. doi:10.1002/elan.200403224.

Capítulo 3

Biosensor amperométrico para la
cuantificación de glucosa basado
en el uso de nanopartículas de
magnetita

Capítulo 3

3.1. Introducción

3.1.1. Nanopartículas magnéticas

En los últimos años las partículas sintetizadas a nanoescala han despertado gran interés debido que presentan propiedades electrónicas, ópticas y magnéticas excepcionales. Un tipo de nanopartículas (NPs) que ha recibido gran atención son las nanoestructuras magnéticas, las cuales pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo [1]. Existe una gran variedad de estas NPs y pueden estar formadas de elementos tales como hierro, cobalto, níquel y óxidos de algunos metales. Entre ellas los óxidos de hierro, como Fe_3O_4 (magnetita) y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita), se han utilizado ampliamente en diversas áreas incluyendo fluidos magnéticos, catálisis, remediación ambiental, sensores, biomedicina y dispositivos de almacenamiento magnético [2–7].

Un problema asociado a partículas de tamaño nanométrico es la inestabilidad intrínseca que poseen y por lo tanto su gran tendencia a formar aglomerados para minimizar la energía asociada con la elevada relación superficie/volumen. Además, estos materiales pueden ser susceptibles a la oxidación, por esto es conveniente recubrir sus superficies con especies orgánicas tales como polímeros y tensioactivos, o con materiales inorgánicos. Los métodos de recubrimiento más utilizados son la adsorción durante la síntesis (*in-situ*) o posterior a la síntesis. Estos revestimientos no sólo impiden la oxidación de las NPs sino que también mejoran su capacidad para formar suspensiones ya que disminuyen su tendencia a aglomerarse [5,8].

Se han empleado diferentes técnicas para producir nanopartículas magnéticas con propiedades uniformes y un estrecho margen de distribución de tamaños. Entre las técnicas de obtención podemos nombrar: descomposición térmica, síntesis hidrotérmica y co-precipitación, entre otras [5,9,10]. En este trabajo de tesis se utilizaron nanopartículas de magnetita (mNPs) sintetizadas por un método simple, de bajo costo y muy efectivo como lo es la molienda mecánica en un molino de bolas de alta energía. Esta técnica se enmarca dentro de la mecanoquímica, término que se emplea para describir el proceso en el que tienen lugar las reacciones químicas y las transformaciones de fase como consecuencia de aplicar energía mecánica [11,12].

Muchos nanomateriales (NMs) entre los cuales se encuentran incluidos los de magnetita, poseen actividad intrínseca similar a las enzimas, como por ejemplo peroxidasa, catalasa, oxidasas, superóxido dismutasa, entre otras [13]. La principal ventaja de la utilización de estos NMs respecto a las enzimas es que son altamente estables, es decir, mantienen su actividad catalítica, incluso en condiciones de trabajo adversas como por ejemplo amplios intervalos de pH, temperaturas elevadas o en presencia de inhibidores enzimáticos [13–16]. Estas propiedades convierten a dichos NMs en excelentes candidatos como enzimas artificiales en reemplazo de las biomoléculas nativas para el diseño de dispositivos biotecnológicos [17,18]. Wei y Wang definieron el término "nanozima", haciendo referencia a las enzimas artificiales basadas en nanomateriales [13]. Debido a que las nanopartículas inorgánicas poseen numerosas ventajas como la simple preparación, alta estabilidad, fácil modificación de la superficie y bajo costo, el concepto de nanozima atrajo un enorme interés en diversos campos de la actividad científica, incluida la química analítica y la nanomedicina [19].

En el año 2007 Yan y colaboradores demostraron que las mNPs poseen actividad intrínseca similar a la peroxidasa y por lo tanto, estas nanopartículas inorgánicas podrían funcionar como una enzima para catalizar la oxidación y

fundamentalmente la reducción de sustratos típicos de la peroxidasa como el peróxido de hidrógeno [20,21]. Desde entonces, las mNPs se han utilizado en reemplazo de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en numerosos trabajos debido a las sobresalientes ventajas que proporciona como catalizador artificial [14,18,22,23]. Por lo tanto, las mNPs pueden aplicarse en sensores y biosensores como materiales enzimo-miméticos para la detección y amplificación de la señal de peróxido de hidrógeno.

3.1.2. Biosensores para glucosa

Por más de 50 años, los dispositivos destinados a la cuantificación de glucosa han sido el ícono clásico en el desarrollo de biosensores. Clark y Lyons, en el año 1962, diseñaron el primer biosensor enzimático para la detección de glucosa, utilizando glucosa oxidasa (GOx) como elemento de biorreconocimiento [24] y desde entonces se han diseñado numerosas estrategias con el objetivo de mejorar la sensibilidad y selectividad [25–34]. En la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de estos dispositivos que se basan en la cuantificación del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente. Sin embargo, sobre electrodos de carbono, es necesario aplicar altos sobrepotenciales para llevar a cabo la determinación. Esto hace que la cuantificación de glucosa sea poco específica a causa de la interferencia de compuestos fácilmente oxidables que están presentes habitualmente en fluidos biológicos, tales como ácido ascórbico y ácido úrico [35–37]. De esta manera, el principal desafío en estos casos, es el desarrollo de estrategias que permitan una disminución importante en los sobrepotenciales necesarios para la oxidación y/o reducción de H_2O_2 . Las más destacadas han sido la incorporación de nanomateriales electrocatalíticos junto al elemento de biorreconocimiento. [36,38–41].

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos para la síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con carbono (mNPs@C) sintetizadas por un método mecanoquímico. Las propiedades estructurales y morfológicas de las nanopartículas se investigaron mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). Puesto que el mencionado nanomaterial tiene actividad catalítica similar a la peroxidasa, se diseñó una plataforma a partir de la incorporación de mNPs@C junto con la enzima glucosa oxidasa (GOx) en un compuesto de grafito (GOx/mNPs@C/CPE), como una estrategia de amplificación de la señal de H₂O₂ una vez efectuado el evento de reconocimiento mediado por GOx, para el desarrollo de una plataforma biosensora para la cuantificación de glucosa.

El bio-nano-compósito GOx/mNPs@C/CPE fue caracterizado por técnicas como voltamperometría cíclica (VC) y amperometría.

3.2. Metodología experimental

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 30 % V/V solución acuosa), la glucosa y el ácido úrico fueron provistos por Merck, mientras que el ácido ascórbico, Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ fueron proporcionados por J. T. Baker. La enzima glucosa oxidasa (GOx) (Tipo X-S, *Aspergillus niger*, (EC 1.1.3.4), 158,900 U/g, catálogo número G-7141) se obtuvo de Sigma. Los sueros liofilizados *Standatrol S-E-2* (Lote N° 1202085070), nivel N1 (N° 085070) y nivel N2 (N° 085070), fueron suministrados por Wiener Lab.

Para la preparación de los compósitos se utilizó polvo de grafito (grado #38), el cual fue provisto por Fischer Scientific y aceite mineral de Sigma-Aldrich. Las micropartículas de magnetita comerciales (mMicroPs, 0,5-1,0 µm) fueron proporcionadas por Strem Productos Químicos. Las mNPs@C y mNPs sin recubrimiento de carbono fueron sintetizadas por Arana y col. [11].

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y se utilizaron sin ninguna purificación previa. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente. Como electrolito soporte se empleó *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura deionizada (MQ, $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), la cual fue obtenida a través de un sistema Milli-Q de Millipore.

3.2.1. Síntesis de mNPs@C

La síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con carbono (mNPs@C) se llevó a cabo en un molino de bolas de alta energía, como se mencionó en el **apartado 3.1**. En lo que respecta al método utilizado, la molienda mecánica es un procedimiento ampliamente difundido y efectivo mediante el cual se producen reacciones químicas en estado sólido a bajas temperaturas, debido a las colisiones entre los precursores (mezcla de polvos). Además, la utilización de un molino de bolas de alta energía favorece la formación de partículas de tamaño nanométrico [12,42].

Para la fabricación de las mNPs@C, se utilizaron como precursores hematita (Fe_2O_3) y carbono activado (C) en una relación de masas 4:1, los cuales fueron introducidos en un recipiente de acero inoxidable con bolas de carburo de tungsteno (WC), como se muestra en la **Figura 3-1**.

A continuación se realizó la molienda a 700 rpm, con una relación de bolas/polvo precursor de 35, bajo atmósfera de Ar, para evitar procesos de oxidación no deseados. El polvo precursor (C- Fe_2O_3) se molió durante 18 horas, sin embargo una vez concluida la molienda, se evidenció por experimentos de DRX la presencia de hematita, dando cuenta que la reacción no habría ocurrido de manera completa. Por lo tanto, con el fin de eliminar la hematita remanente se realizó un tratamiento térmico durante 2 horas a 500°C en atmósfera de Ar. La

temperatura fue seleccionada cuidadosamente para provocar la reducción de hematita y evitar un crecimiento significativo de las nanopartículas, así como la pérdida de carbono [43].

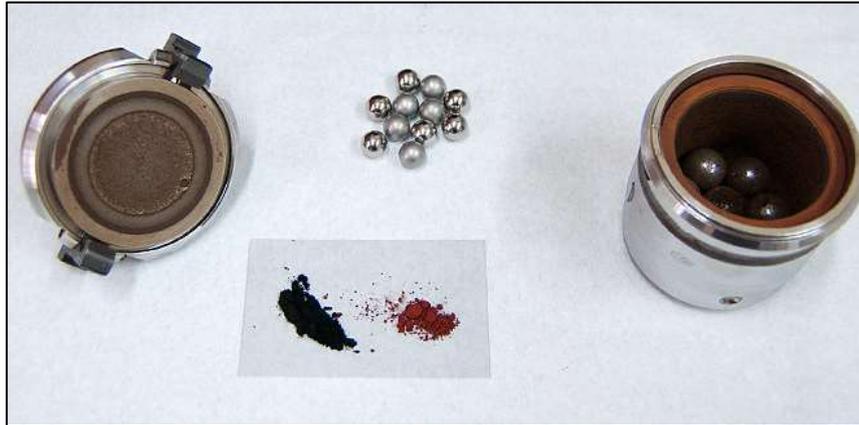
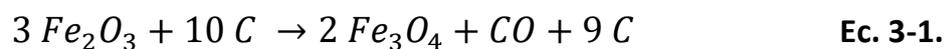


Figura 3-1. Fotografía de los precursores para la síntesis de las nanopartículas de magnetita: carbono activado (negro), hematita (rojizo), junto al recipiente donde se producirán las nanopartículas. Imagen tomada de referencia [44].

La formación de magnetita (Fe_3O_4) ocurre por reducción del hierro de la hematita, de acuerdo a la siguiente reacción:



Cabe señalar que, en esta síntesis el carbono se encuentra en exceso respecto a la hematita; por lo tanto, una vez concluido el proceso de fabricación de las mNPs, quedará carbono remanente en la muestra cubriendo las partículas de magnetita formadas.

3.2.2. Preparación de los electrodos de trabajo

Una vez obtenidas y caracterizadas las mNPs@C se utilizaron para la preparación de un electrodo compósito de pasta de carbono (CPE). El CPE se preparó de forma regular mezclando mecánicamente polvo de grafito y aceite mineral, en una proporción 70%-30% P/P respectivamente, durante 30 min en un mortero de ágata.

Se prepararon diversos CPEs conteniendo proporciones diferentes de mNPs@C (mNPs@C/CPE). Asimismo, se preparó de manera similar, un CPE con micropartículas de magnetita comerciales (mMicroPs) de 0,5-1,0 mm de diámetro (mMicroPs/CPE) y otro con nanopartículas de magnetita (mNPs) que no se encuentran recubiertas con carbono (mNPs/CPE), con un diámetro nominal de 20 nm, sintetizadas por co-precipitación. Para todos los compósitos, en primer lugar se mezclaron las partículas de magnetita correspondientes (mNPs@C, mNPs o mMicroPs) con aceite mineral durante 3 minutos, seguido de la incorporación del polvo de grafito y mezclado por 30 minutos adicionales. En el caso del electrodo enzimático (GOx/mNPs@C/CPE), se mezcló en una primera etapa GOx, mNPs@C y aceite mineral durante 10 minutos, luego a esta mezcla se le incorporó el polvo de grafito completando el tiempo de mezclado. En la **tabla 3-1** se presentan a modo de resumen los electrodos preparados. Finalmente, una porción de la pasta resultante se colocó en la cavidad de un tubo de teflón de 3 mm de diámetro. El contacto eléctrico se estableció mediante un tornillo de acero inoxidable. Posteriormente el electrodo resultante fue pulido en papel antes de cada medida experimental, obteniendo una nueva superficie de manera muy sencilla.

Tabla 3-1. Descripción de los electrodos preparados con las distintas NPs, MicroPs y GOx.

Compósito	% mNPs@C	% mMicroPs	% mNPs	% GOx
CPE	-	-	-	-
2,5%mNPs@C/CPE	2,5	-	-	-
5%mNPs@C/CPE	5,0	-	-	-
10%mNPs@C/CPE	10,0	-	-	-
20%mNPs@C/CPE	20,0	-	-	-
5%mMicroPs/CPE	-	5,0	-	-
10%mNPs/CPE	-	-	10,0	-
5%GOx/10%mNPs@C/CPE	10,0	-	-	5,0
5%GOx/CPE	-	-	-	5,0

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Caracterización morfológica y estructural de mNPs@C

Para obtener mayor información y caracterizar las nanopartículas sintetizadas se utilizaron diversas técnicas complementarias como: SEM, TEM, HRTEM y DRX.

3.3.1-A. Caracterización SEM y TEM

Para la caracterización morfológica de las mNPs@C, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido. Las micrografías SEM tomadas se muestran en la **Figura 3-2**. A partir del análisis de estas imágenes se puede concluir que las

partículas son de tamaño nanométrico y se encuentran soportadas sobre carbono, observándose partículas individuales y aglomerados de las mismas.

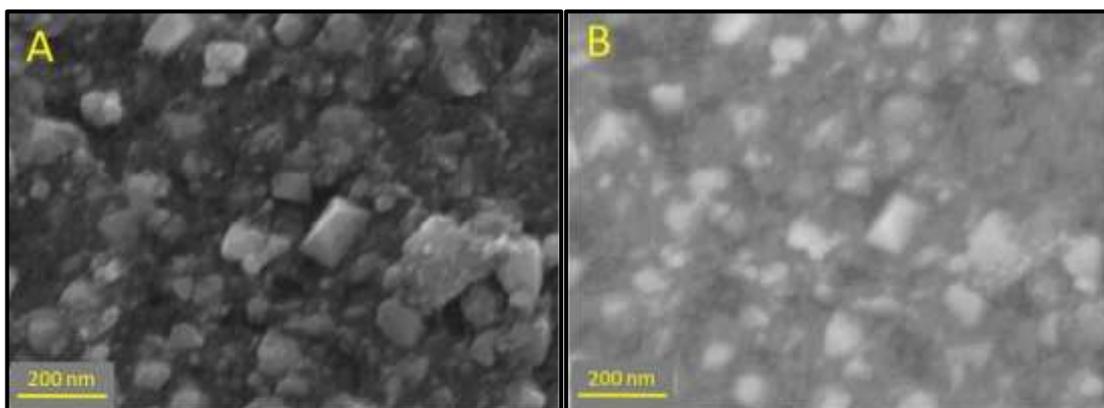


Figura 3-2. Imágenes SEM de mNPs@C. **A.** Obtenida a partir de electrones secundarios y **B.** Obtenida a partir de electrones retrodispersados.

En la **Figura 3-2.A** se muestra una imagen de electrones secundarios y en **Figura 3-2.B** una imagen de electrones retrodispersados. En esta última, los elementos con número atómico más alto aparecen más brillantes que los elementos de menor número atómico. Por consiguiente, de la comparación de las imágenes se puede concluir que los cristales nanométricos de magnetita (imagen más brillante) están inmersos en una matriz de carbono amorfo, y se encuentran homogéneamente distribuidos. Estos resultados fueron confirmados por microscopía de transmisión electrónica, donde además se obtuvo información más detallada acerca de la forma y el tamaño de las NPs. En la **Figura 3-3**, donde se muestran imágenes TEM (**A**) y HRTEM (**B**) se puede observar claramente nanopartículas con estructura cristalina, recubiertas por una fase amorfa, atribuida al carbono. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos a través de las imágenes SEM. En la figura insertada en la **Figura 3-3.B** se muestra una imagen HRTEM obtenida con mayor magnificación, donde se identificó un único valor de espaciamiento interplanar, atribuido al plano (111) de la magnetita ($d=4,847 \text{ \AA}$, como indican las flechas).

En **Figura 3-3.C** se presenta un gráfico de distribución normal de tamaño (diámetro vs número de NPs), calculado a partir de las imágenes TEM. Como se puede apreciar, la mayoría de las NPs presenta un tamaño promedio de 20 nm.

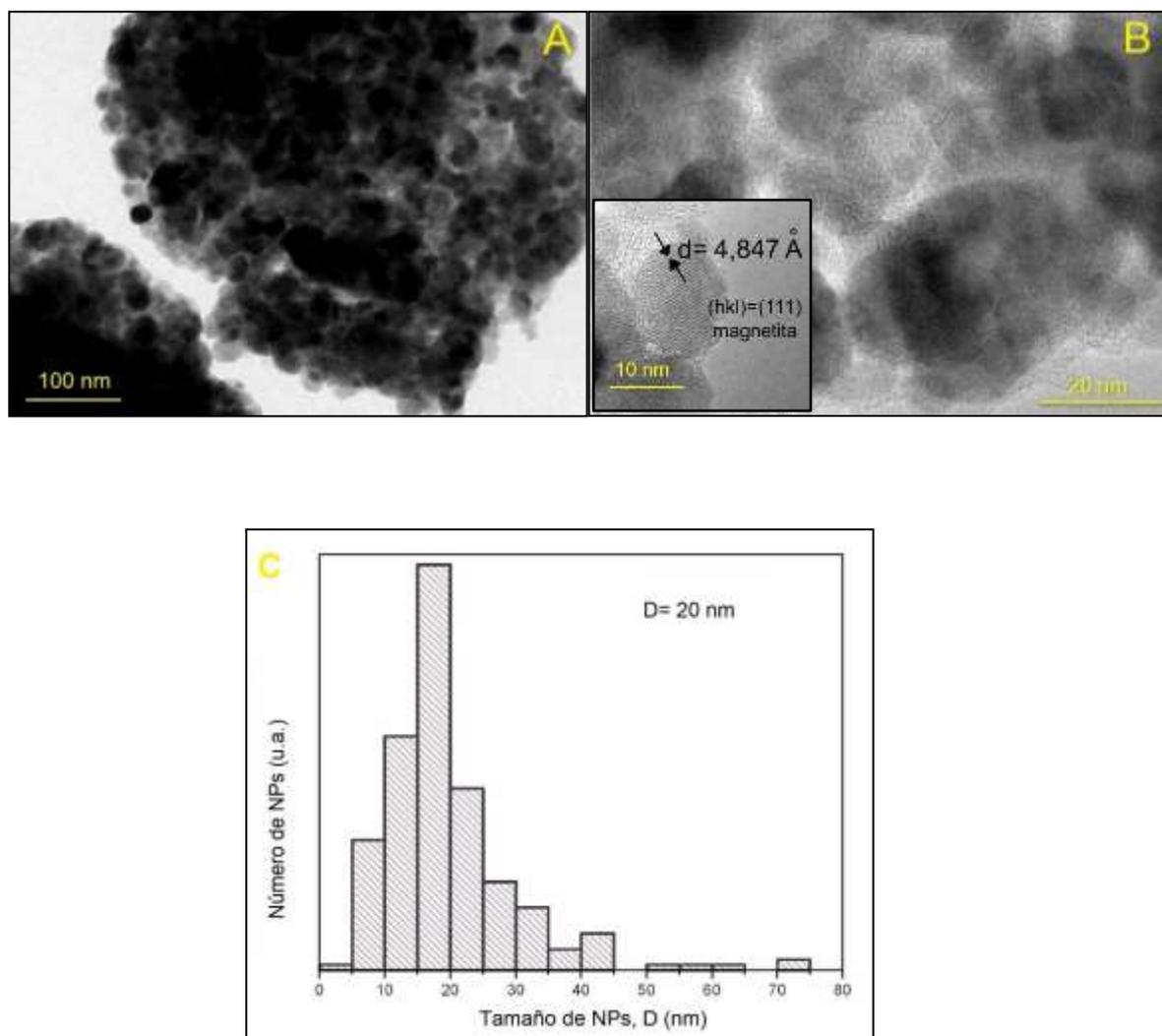


Figura 3-3. A. Imagen TEM y B. HRTEM de mNPs@C. C. Distribución de tamaño de las mNPs@C, D medio: 20 nm.

3.3.1-B. Caracterización por DRX

La **Figura 3-4.A** muestra los difractogramas correspondiente a los precursores de la síntesis: hematita (material cristalino) y carbono activado (amorfo). El patrón de DRX de la hematita presenta los picos de difracción

característicos, sin embargo, en el caso del carbono no se observan picos de difracción ya que posee una estructura amorfa. En la **Figura 3-4.B** se muestra el patrón de DRX para mNPs@C, en el cual se pueden observar picos de difracción a $2\theta = 30,1^\circ$; $35,2^\circ$; $43,1^\circ$; $53,7^\circ$; $57,1^\circ$ y $62,5^\circ$ correspondientes a las reflexiones (220), (311), (400), (422), (511) y (440) de los planos cristalinos de la estructura cúbica de Fe_3O_4 (JCPDS Nro. 19-0629) [17,45]. Asimismo, se observa ausencia de los picos característicos de hematita, indicando que el material cristalino presenta una sola fase, dando cuenta de que la síntesis fue completa [11].

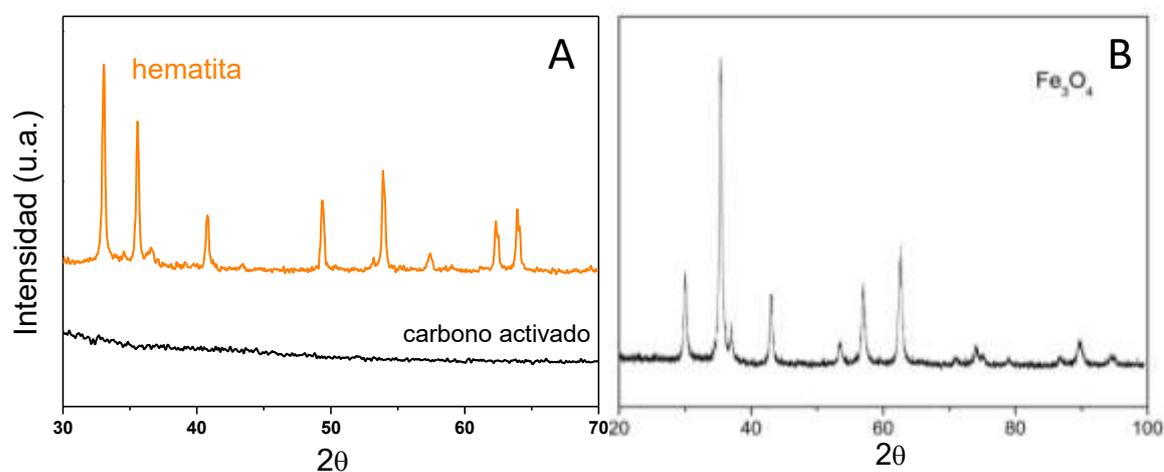


Figura 3-4. Patrón de DRX de los precursores (A) y nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas con carbono (B).

Conforme a los resultados presentados, se puede afirmar que mediante un método simple y económico, las mNPs@C fueron sintetizadas exitosamente.

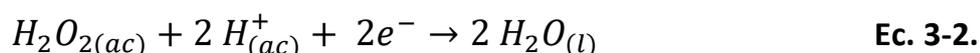
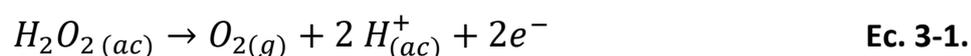
3.3.2. Caracterización electroquímica de mNPs@C/CPE

Con el objetivo de caracterizar electroquímicamente las mNPs@C sintetizadas y al mismo tiempo explorar la actividad catalítica similar a la peroxidasa que presentan estas nanopartículas [21], se prepararon diferentes electrodos

descritos en la **sección 3.2.2**. A través de voltamperometría cíclica y amperometría se estudió el comportamiento electroquímico de los CPEs modificados con distintas partículas de magnetita (mNPs, mMicroPs y mNPs@C). Para ello se emplearon diversos marcadores redox como peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico y ácido úrico.

3.3.2-A. Efecto de la incorporación de magnetita en la matriz compósito

En vista de las aplicaciones analíticas de la plataforma, en relación a la detección de glucosa, se comenzó estudiando la capacidad catalítica de las partículas de magnetita hacia peróxido de hidrógeno, producto electroactivo de la reacción enzimática mediada por GOx. Las reacciones de oxidación y reducción de esta sonda se muestran a continuación en las ecuaciones **3-1.** y **3-2.** respectivamente:



Se realizaron experimentos voltamperométricos en una solución de H₂O₂ 0,010 M preparada en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, entre -0,200 y +0,800 V. En estos experimentos se emplearon CPE (—), CPE modificado con 5,0 % P/P de micropartículas comerciales mMicroPs (—) y CPE modificado con 5,0 % P/P de nanopartículas mNPs@C (—). Es importante remarcar que se utilizaron partículas de diferente tamaño, micropartículas y nanopartículas, con el objetivo de evaluar la importancia de las dimensiones de las partículas en la catálisis hacia peróxido

de hidrógeno. La respuesta electroquímica de la sonda se presenta en la **Figura 3-5**.

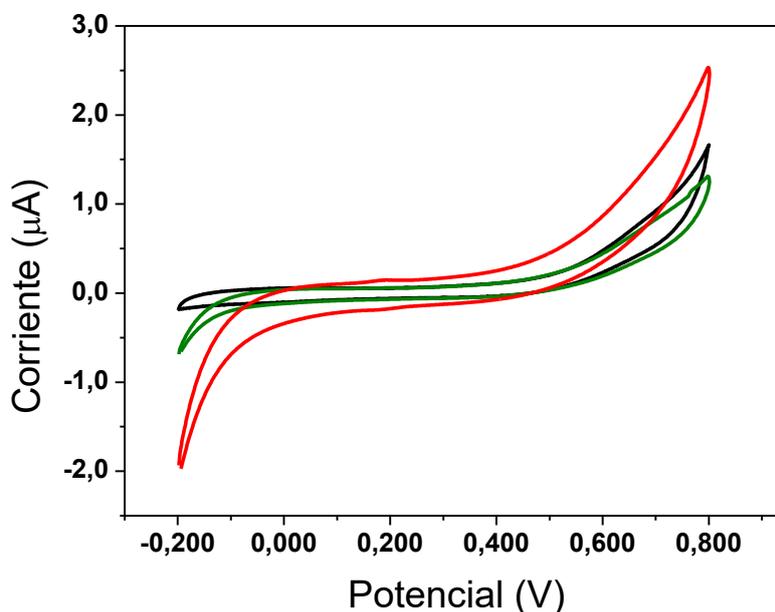


Figura 3-5. Voltamperogramas cíclicos en H_2O_2 0,010 M sobre CPE (—), CPE modificado con 5,0 % P/P de micropartículas comerciales de Fe_3O_4 (—) y CPE modificado con 5,0 % P/P de nanopartículas mNPs@C (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. M. Velocidad de barrido: $0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Sobre CPE el proceso de oxidación de H_2O_2 comienza a sobrepotenciales elevados cercanos a +0,600 V, mientras que el proceso de reducción se encuentra muy pobremente definido. Del análisis de los voltamperogramas de los electrodos modificados se observa que la incorporación de partículas magnéticas, indistintamente del tamaño, produce una disminución de los sobrepotenciales de reducción del H_2O_2 , lo cual es más evidente sobre el electrodo que contiene las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con carbono (5% mNPs@C/CPE (—)). Para la plataforma 5% mMicroPs@C/CPE (—) la reducción comienza a sobrepotenciales más negativos que 0,000 V; mientras que, para 5% mNPs@C/CPE (—) a sobrepotenciales más negativos que +0,200 V, debido a la excelente actividad electrocatalítica de NPs de magnetita hacia la reducción del peróxido de hidrógeno [22,46,47]. Es importante remarcar que 5% mNPs@C/CPE también cataliza la

oxidación del peróxido de hidrógeno, comenzando a potenciales mayores que +0,300 V, aunque este efecto es menos pronunciado que en el caso de la reducción.

Debido a que el peróxido de hidrógeno no presenta picos de óxido-reducción, se determinaron los valores absolutos de corriente anódica (I_a) y catódica (I_c) para cada electrodo a valores de potencial fijo para cada proceso redox. En el caso de la oxidación se eligió un potencial de +0,700 V, mientras que para la reducción -0,100 V. Se compararon las respuestas sobre las distintas plataformas, como se ilustra en la **Figura 3-6**.

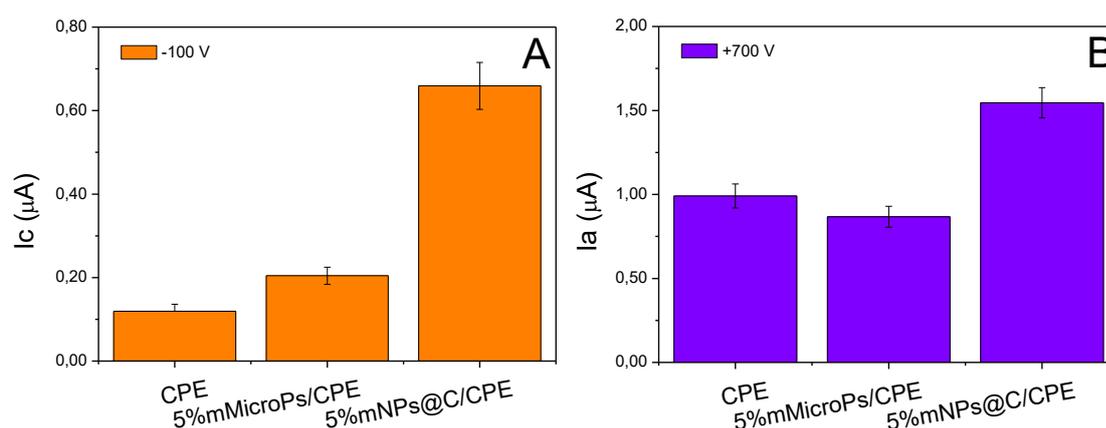


Figura 3-6. Corrientes de reducción y oxidación de H_2O_2 (I_c y I_a) obtenidas a -0,100 V (A) y a +0,700 V (B), respectivamente. Para los electrodos: CPE, 5% mMicroPs/CPE y 5% mNPs@C/CPE a partir de los experimentos voltamperométricos mostrados en **Figura 3-5**.

En consecuencia, cuando se incorporan mMicroPs en el compósito, la corriente catódica aumenta 1,7 veces con respecto a CPE, siendo los valores ($0,12 \pm 0,02$) μA y ($0,20 \pm 0,02$) μA para CPE y 5% mMicroPs/CPE, respectivamente, mientras que para la corriente anódica no se observan diferencias significativas. Por otro lado, para el caso de 5% mNPs@C/CPE el valor de la corriente catódica asciende a ($0,66 \pm 0,05$) μA , es decir se produce una mejora ligeramente mayor a

5 veces respecto de la obtenida para CPE. Del mismo modo, la corriente anódica presenta un incremento de $(0,99 \pm 0,07) \mu\text{A}$ a $(1,55 \pm 0,09) \mu\text{A}$. De esta manera se ponen de manifiesto las propiedades electrocatalíticas de las magnetitas y la mejora en la respuesta electroquímica debido al empleo de partículas de tamaño nanométrico. Esto se debe al aumento del área electroactiva, propio de la utilización de nanomateriales, ya que las NPs presentan mayor cantidad de sitios activos accesibles en comparación con las partículas más grandes, lo cual es atribuido a la cantidad de átomos expuestos en la superficie del material [48].

En referencia a los resultados obtenidos se seleccionó $-0,100 \text{ V}$ como potencial de trabajo para futuros experimentos amperométricos, teniendo en cuenta que la detección de peróxido de hidrógeno a potenciales negativos ofrece una buena alternativa para la cuantificación enzimática selectiva de glucosa.

La **Figura 3-7** muestra amperogramas obtenidos sobre CPE (—) y 5%*mNPs@C/CPE* (—) a $-0,100 \text{ V}$ para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ en *buffer* fosfato $0,050 \text{ M}$ a $\text{pH } 7,40$.

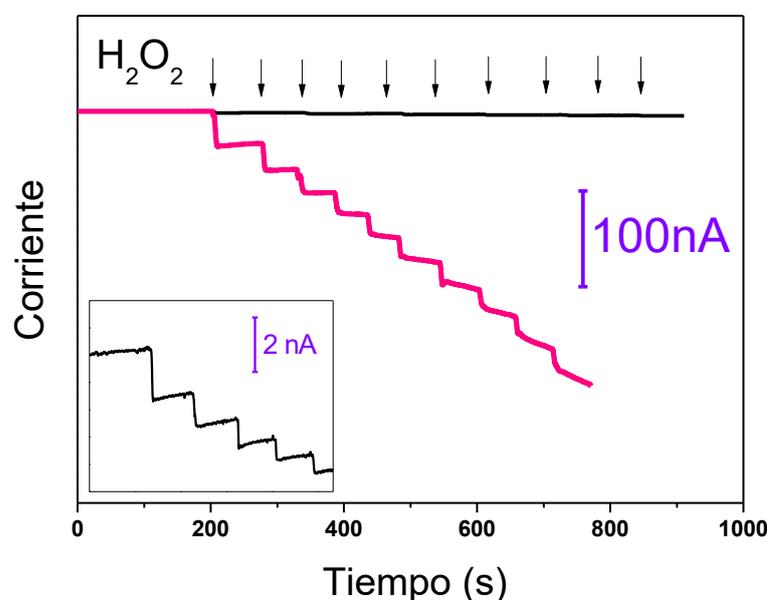


Figura 3-7. Registros amperométricos a $-0,100 \text{ V}$ para adiciones sucesivas de H_2O_2 $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ obtenidas sobre CPE (—) y 5%*mNPs@C/CPE* (—). **Figura insertada:** detalle ampliado de los registros amperométricos para CPE. Electrolito soporte: *buffer* fosfato $0,050 \text{ M}$, $\text{pH } 7,40$. Las flechas indican los agregados de H_2O_2 .

Dichos resultados se encuentran en concordancia con los experimentos voltamperométricos presentados anteriormente, donde se puede observar claramente la respuesta incrementada hacia H_2O_2 en el compuesto que contiene las mNPs@C.

3.3.2-B. Estudio del contenido de mNPs@C en los compósitos.

Un parámetro muy crítico relacionado directamente con el desempeño analítico del sensor es la optimización del contenido de nanopartículas en la matriz de carbono. Para tal fin, se analizaron distintos porcentajes: 2,5 %; 5,0 %; 10,0 %; 15,0 % y 20,0 % P/P de mNPs@C, comparándolos con CPE sin modificar.

La **Figura 3-8** muestra voltamperogramas cíclicos obtenidos en las mismas condiciones descritas en la **sección 3.3.2-A**. Empleando compósitos con cantidades creciente de NPs.

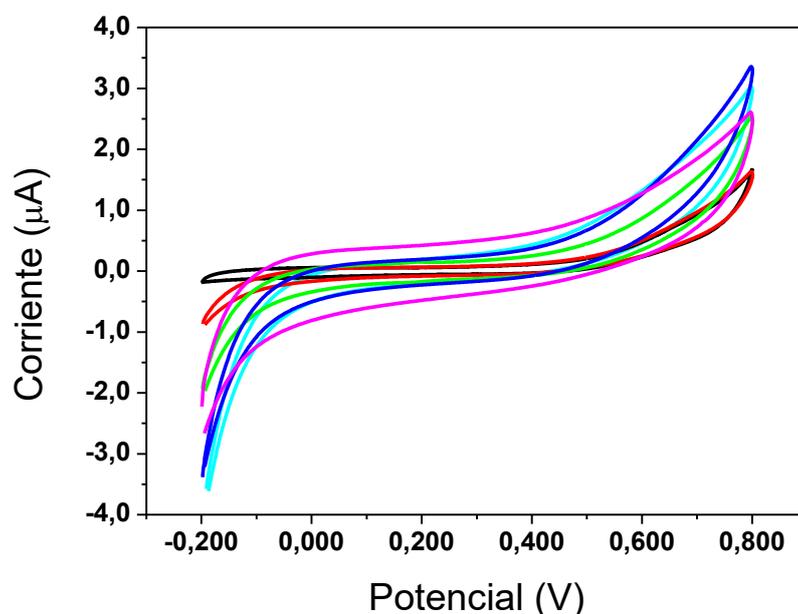


Figura 3-8. Voltamperogramas cíclicos en H_2O_2 0,010 M sobre CPE (—), 2,5% mNPs@C/CPE (—), 5% mNPs@C/CPE (—), 10% mNPs@C/CPE (—), 15% mNPs@C/CPE (—) y 20% mNPs@C/CPE (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. M. Velocidad de barrido: 0,100 V s^{-1} .

A medida que se incrementa la cantidad de nanomaterial en el compósito, se observa un aumento de los valores de corriente catódica, en todos los casos va acompañado de un aumento importante en la corriente capacitiva. Este último fenómeno es más evidente para el compósito 20%*mNPs@C*/CPE (—) y se debe al comportamiento resistivo debido a una mala aglutinación de la matriz de grafito cuando el contenido de NPs es elevado, como ha sido informado anteriormente por otros autores [49].

En la **Figura 3-9**, donde se representa la corriente de reducción (I_c) de peróxido de hidrógeno (a -0,100 V) en función del contenido de magnetita en la matriz electródica: 0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 % (obtenido del análisis de los registros voltamperométricos de la **Figura 3-8**), se puede advertir que la corriente incrementa linealmente con el contenido de *mNPs@C* hasta 10,0 %. Mientras que, para porcentajes mayores de nanopartículas se observa un marcado aumento en la irreproducibilidad. Adicionalmente, se realizó la comparación de las corrientes de reducción para 5%*mNPs*/CPE y 10%*mMicroPs*/CPE respecto de los electrodos modificados con 5,0 y 10,0 % de *mNPs@C*.

Mediante este estudio comprobó que la respuesta electroquímica para el compósito que contiene *mNPs@C* es sustancialmente mayor en comparación con *mMicroPs* y *mNPs*. Por lo tanto, se observa un mejor desempeño hacia la reducción de peróxido de hidrógeno debido al tamaño nanométrico de las *mNPs* y la importancia del carbono como material soporte de las mismas, el cual provee un entorno propicio para el incremento en la actividad catalítica y en la transferencia de electrones.

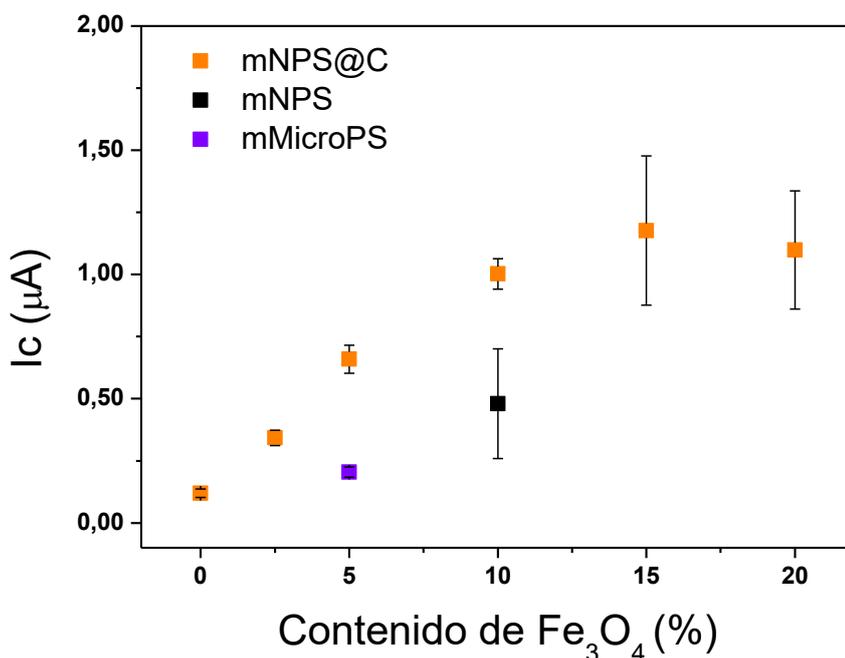


Figura 3-9. Corrientes de reducción para H₂O₂ a -0,100 V en función del contenido de mNPs@C (0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0), en comparación con los electrodos modificados con 10,0% de mNPs sin carbono y 5,0 % mMicroPs, a partir de los experimentos voltamperométricos mostrados en iguales condiciones de la **Figura 3-8**.

Para continuar con la optimización, se realizaron experimentos amperométricos. En la **Figura 3-10.A** se representan las curvas de calibración obtenidas a partir de registros amperométricos realizados a -0,100 V para agregados sucesivos de peróxido de hidrógeno $1,00 \times 10^{-3}$ M en *buffer* fosfato 0,050 M a pH 7,40, sobre sobre CPE (—), 2,5% mNPs@C/CPE (—), 5% mNPs@C/CPE (—), 10% mNPs@C/CPE (—), 15% mNPs@C/CPE (—) y 20% mNPs@C/CPE (—) y 10% mNPs/CPE (—). Asimismo, en la **Figura 3-10.B** se ilustran las sensibilidades correspondientes, cuyos valores se detallan en la **Tabla 3-2**.

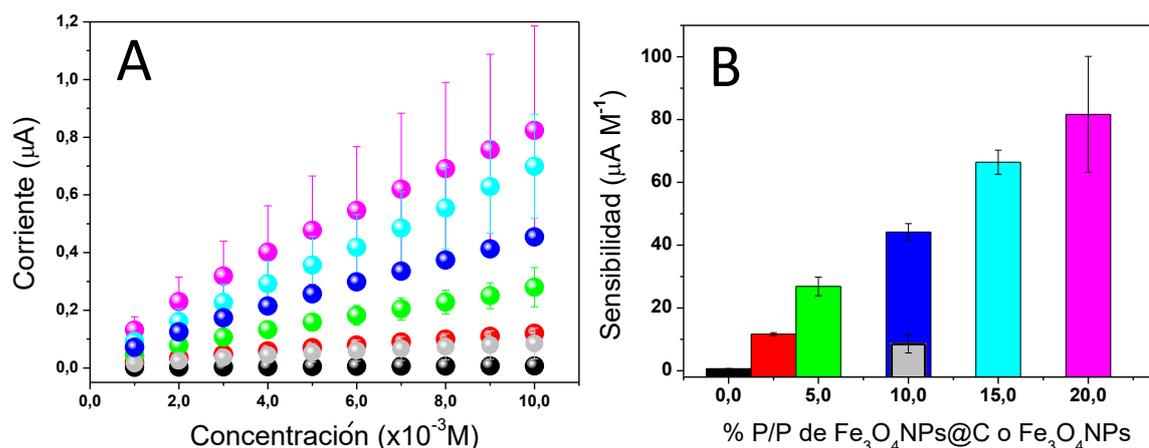


Figura 3-10. A. Curvas de calibración obtenidas a partir de registros amperométricos para sucesivas adiciones de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre CPE variando el porcentaje de mNPs@C: 0% (—); 2,5% (—); 5,0% (—); 10,0% (—); 15,0% (—) y 20,0% (—), en comparación con los electrodos modificados con 10,0% de mNPs sin carbono (—). **B.** Sensibilidades obtenidas a partir de las curvas de calibración respectivas mostradas en (A) en función del porcentaje de mNPs@C o mNPs. Potencial de trabajo: -0,100 V. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40 M.

Tabla 3-2. Sensibilidades obtenidas a partir de las curvas de calibración mostradas en Figura 3-10.

Electrodo	Sensibilidad (μAM^{-1})
CPE	(0,63 ± 0,07)
2,5% mNPs@C/CPE	(11,7 ± 0,5)
5% mNPs@C/CPE	(27 ± 3)
10% mNPs@C/CPE	(44 ± 3)
15% mNPs@C/CPE	(66 ± 4)
20% mNPs@C/CPE	(8 ± 2) × 10 ¹
10% mNPs/CPE	(9 ± 3)

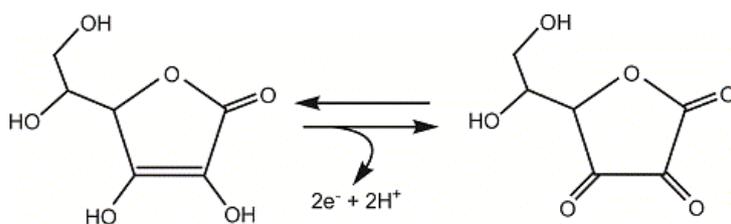
Del análisis de los datos amperométricos se observa un incremento de las sensibilidades lo cual está estrechamente relacionado con el contenido de

nanopartículas en el electrodo, encontrándose además mayor irreproducibilidad en los compósitos con alto porcentaje de mNPs@C. También se denota una disminución en la sensibilidad para el compósito que contiene 10,0% de mNPs en comparación con 10% mNPs@C/CPE. Esta observación sugiere que el carbono que rodea las nanopartículas proporciona un mejor ambiente para la actividad catalítica y la transferencia de electrones. Estos resultados se correlacionan con el análisis de los experimentos voltamperométricos presentados previamente (**Figura 3-9**).

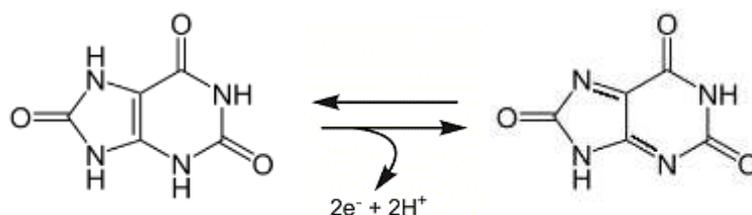
Sobre la base de lo expuesto, se seleccionó 10,0% P/P como composición óptima de mNPs@C para obtener el mejor compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno.

3.3.2-C. Respuesta voltamperométrica para AA y AU

Otros marcadores ampliamente utilizados en la caracterización de biosensores electroquímicos para glucosa son ácido ascórbico (AA) y ácido úrico (AU). Estos compuestos son fácilmente oxidables y generalmente están presentes en fluidos biológicos. Este es un aspecto muy importante a tener en cuenta en las estrategias para el desarrollo de biosensores de glucosa, puesto que son interferentes muy frecuentes. Las reacciones de óxido-reducción de ambos compuestos se muestran a continuación (**Ecuación 3-3** y **3-4** respectivamente).



Ec. 3-3.



Ec. 3-4.

A fin de determinar el efecto que producen las nanopartículas presentes en el compuesto sobre el comportamiento electroquímico de estos compuestos, en primer lugar se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica. La **Figura 3-11.A** muestra los perfiles voltamperométricos para AA $1,0 \times 10^{-3}$ M y la **Figura 3-11.B** los correspondientes a AU $5,0 \times 10^{-4}$ M, ambos sobre CPE (—) y 10%*m*NPs@C/CPE (—).

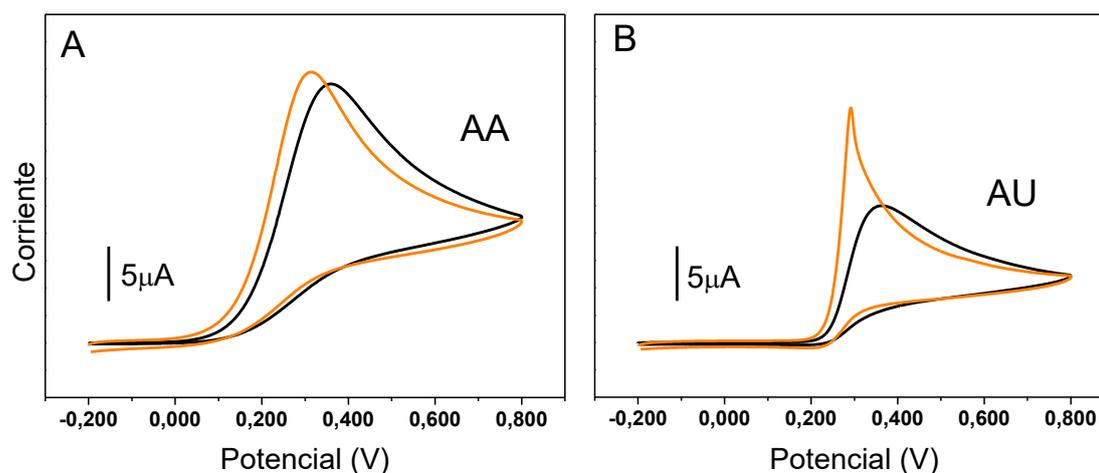


Figura 3-11. Voltamperogramas cíclicos para ácido ascórbico (AA) $1,0 \times 10^{-3}$ M (A) y ácido úrico $5,0 \times 10^{-4}$ M (AU) (B) sobre CPE (—) y 10%*m*NPs@C/CPE (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. M. Velocidad de barrido: $0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Del análisis de los voltamperogramas se deduce que sobre 10%*m*NPs@C/CPE hay un corrimiento del potencial de pico (E_p) para el proceso de oxidación de ambos compuestos respecto de CPE. El E_p presenta un corrimiento de 0,046 V para AA hacia potenciales más negativos y un ligero incremento en la corriente de pico (I_p). Para el caso de AU el efecto catalítico es más evidente, con

un desplazamiento hacia valores negativos de E_p de 0,073 V y un aumento de la I_p de 12,5 a 21,6 μA . Es decir, mNPs@C cataliza tanto la oxidación de AA como AU, siendo más marcada en este último. A pesar de esto, no se observan corrientes de oxidación al potencial de trabajo seleccionado (-0,100 V) para ninguno de los dos compuestos.

Por último, para complementar los estudios de VC se evaluó la respuesta de AA y AU por amperometría. En la **Figura 3-12**, se ilustra la respuesta amperométrica sobre 10% mNPs@C/CPE, a -0,100 V en *buffer* fosfato 0,050 M, frente a un agregado de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M seguido de diez adiciones de AU $1,0 \times 10^{-5}$ M y diez adiciones de AA $2,0 \times 10^{-6}$ M (**b**). Del análisis de los perfiles amperométricos se observa que sólo hay respuesta frente a la adición de peróxido de hidrógeno, no ocurriendo respuesta tanto de AU como de AA en estas condiciones de trabajo.

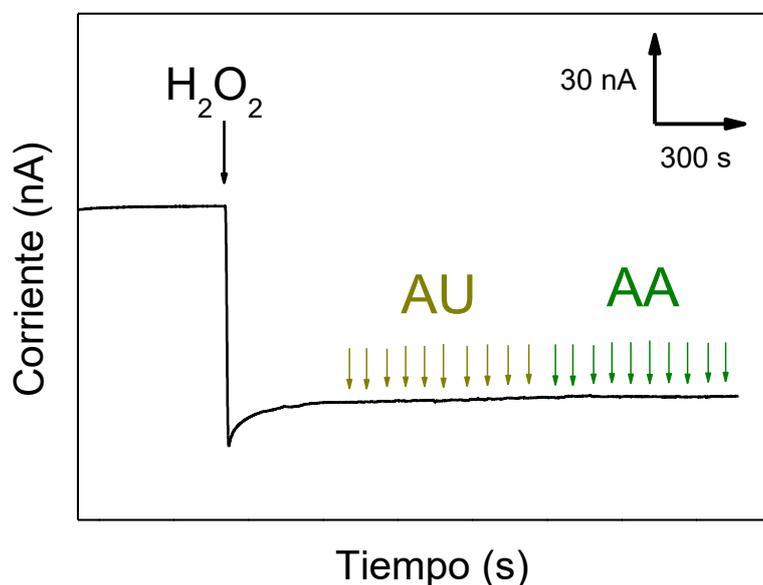


Figura 3-12. Registros amperométricos para un agregado de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M, seguido de 10 agregados de ácido úrico $1,0 \times 10^{-5}$ M (AU) y 10 agregados de ácido ascórbico (AA) $2,0 \times 10^{-6}$ M sobre 10% mNPs@C/CPE. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. Potencial de trabajo: - 0,100 V.

En resumen, del análisis de los resultados presentados se desprende que, si bien existe una pequeña catálisis para AU y AA, no se observa interferencia de estos compuestos para la determinación de H_2O_2 a $-0,100$ V. Por lo tanto, se seleccionó $-0,100$ V como potencial de trabajo óptimo para los subsiguientes experimentos.

3.3.3. Construcción de un biosensor de glucosa

Debido al excelente desempeño de mNPs@C/CPE hacia la reducción de peróxido de hidrógeno y la selectividad demostrada, se empleó esta plataforma para el diseño de un biosensor para la detección de glucosa. Por consiguiente, se modificó el compósito $10\%\text{mNPs@C/CPE}$ con glucosa oxidasa (GOx) como biocatalizador para la reacción de oxidación enzimática de glucosa.

En presencia de glucosa la enzima GOx cataliza la oxidación de ésta a gluconolactona. Para que esta reacción ocurra se requiere la presencia de oxígeno, el cual es el regenerador natural del sitio activo de la enzima (cofactor flavina adenina dinucleótido, FAD). Como producto de la regeneración de GOx se forma peróxido de hidrógeno, siendo este compuesto el que se reduce en la superficie del electrodo. Como se esquematiza en la **Figura 3-13**.

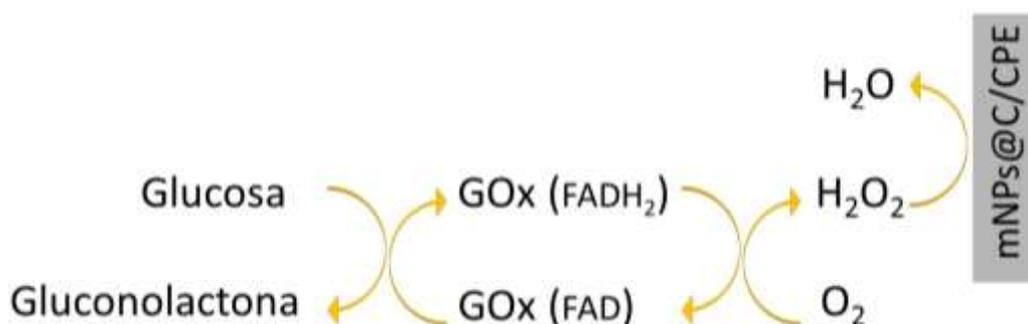


Figura 3-13. Esquema de detección del biosensor GOx/ mNPs@C/CPE

La cantidad de enzima a incorporar en el compósito es un parámetro importante a tener en cuenta, generalmente la cantidad utilizada en el desarrollo de biosensores se encuentra entre 5,0-10,0% P/P [49,50]. Además, cabe destacar que para cantidades excesivas de GOx, comúnmente superior al 10,0 % P/P, el consumo de oxígeno se vuelve más importante, lo que produce un acortamiento del intervalo lineal [35,49]. Por lo tanto se seleccionó el 5,0% P/P de GOx como la mejor relación de compromiso para modificar el compósito.

3.3.4. Desempeño analítico de GOx/mNPs@C/CPE

Se analizó el desempeño de la plataforma diseñada obteniéndose los parámetros analíticos y cinéticos de la respuesta a glucosa. Asimismo, se llevaron a cabo estudios de selectividad, evaluando el comportamiento del biosensor en estas condiciones de trabajo con la finalidad de implementar su posible aplicación en muestras reales.

3.3.4-A. Determinación de parámetros analíticos

Con el fin de evaluar el desempeño del biosensor se estudió, a través de ensayos amperométricos frente a agregados de glucosa, la respuesta hacia la reducción del peróxido de hidrógeno producido durante la regeneración del sitio activo de la enzima. En la **Figura 3-14.A** se presenta un perfil de corriente en función del tiempo para adiciones sucesivas de glucosa $2,5 \times 10^{-4}$ M, a -0,100 V en *buffer* fosfato 0,050 M. Los amperogramas muestran una respuesta es rápida y bien definida frente a cada agregado de glucosa debido a la reducción del H₂O₂ generado enzimáticamente.

En la **Figura 3-14.B** se presenta la curva de calibración correspondiente a los registros amperométricos que se muestran en la figura **A**. En la figura insertada en la **Figura 3-14.B** se muestra una curva de calibración obtenida para un intervalo más extendido de concentraciones para agregados de glucosa $6,25 \times 10^{-4}$ M. La respuesta crece linealmente hasta concentraciones de glucosa de $7,50 \times 10^{-3}$ M (135 mg/dL), valores que comprenden el rango fisiológico completo y valores incipientes del rango patológico. Para concentraciones más elevadas de glucosa, la corriente aumenta de manera no lineal, como es común observar en las reacciones biocatalizadas [49,51].

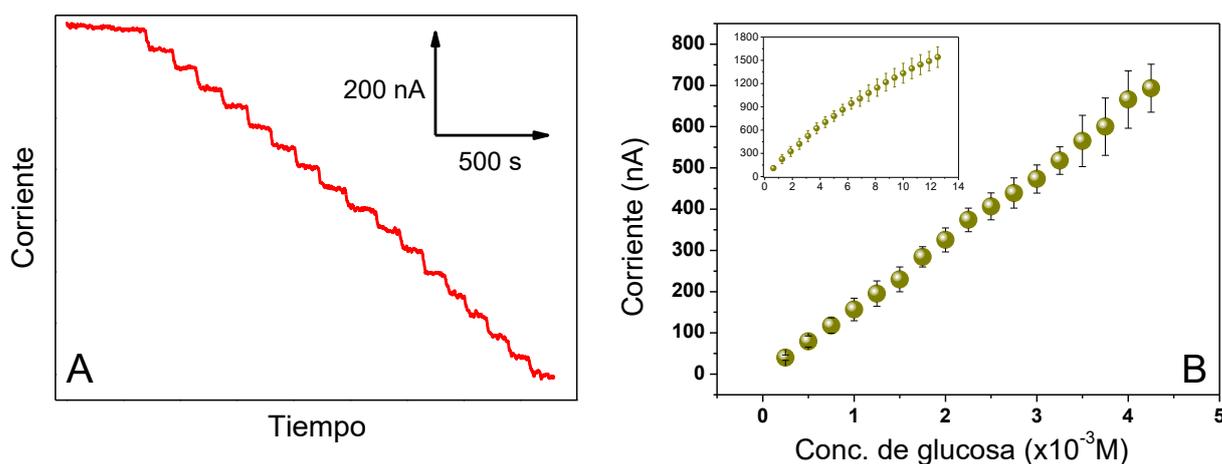


Figura 3-14. A. Registros amperométricos a $-0,100$ V para adiciones sucesivas de glucosa $2,50 \times 10^{-4}$ M obtenidos sobre 5%GOx/10%*m*NPs@C/CPE. **B.** Curva de calibración correspondiente a los registros amperométricos realizados en las mismas condiciones de trabajo que el mostrado en **A**. Figura insertada: curva de calibración para 20 agregados de glucosa $6,25 \times 10^{-4}$ M. Electrolito soporte: *Buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. Potencial de trabajo: $-0,100$ V.

La sensibilidad (S), el límite de detección (LD), calculado como $3,3\sigma/S$ (donde σ es la desviación estándar de la señal blanco), el límite de cuantificación (LQ), calculado como $10\sigma/S$, el coeficiente de correlación lineal (R^2) y el intervalo lineal (IL) se resumen en la **tabla 3-2**.

Tabla 3-2. Parámetros analíticos de la plataforma 5%GOx/10%*m*NPs@C/CPE

S (nAM⁻¹)	$(1,62 \pm 0,05) \times 10^5$
LD (M)	$2,0 \times 10^{-6}$
LQ (M)	$6,1 \times 10^{-6}$
R²	0,9992
IL (M)	$2,5 \times 10^{-4} - 7,5 \times 10^{-3}$

El bioelectrodo resultante demostró un muy buen rendimiento analítico, con alta sensibilidad y selectividad, comparable e incluso mejor que biosensores reportados por otros autores utilizando nanopartículas de magnetita, los cuales se encuentra resumidos en la **tabla 3-3** [36,47,49,59–63].

Adicionalmente para determinar el tiempo de respuesta del biosensor se realizaron experimentos amperométricos para un agregado de glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M, equivalente a 0,90 g/dL (valor contemplado dentro del rango fisiológico normal). Como resultado se encontró que se requieren (11 ± 1) segundos para alcanzar el 90 % del valor de la corriente en estado estacionario. El tiempo de respuesta del biosensor es comparable con el de los dispositivos disponibles comercialmente para la medición descentralizada de glucosa.

Por otra parte se realizaron ensayos amperométricos sobre 5%GOx/CPE, un compósito que no contiene nanopartículas de magnetita. Como era de esperar, no se obtuvo respuesta debido a la ausencia de catalizador para la reducción de H₂O₂, sumado a la pobre reducción que presenta éste sobre CPE.

Tabla 3-3. Comparación del desempeño analítico de diferentes biosensores para la determinación de glucosa.

Biosensor	Sensibilidad	LD (M)	Intervalo lineal (M)	R ²	Estabilidad a largo plazo	Ref.
GOx-Fe-CPE	$(8,8 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ nA M}^{-1}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-2}$	N/D	91% después de 140 días (4°C)	[36]
BQ-Fe ₃ O ₄ -CPEE	$1,66 \times 10^9 \text{ nA M}^{-1}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-8} - 3,1 \times 10^{-6}$	0,975	N/D	[47]
GOx-Fe ₃ O ₄ -CPE	$(3,2 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ nA M}^{-1}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3} - 8,0 \times 10^{-3}$	N/D	90% después de 10 meses (4°C)	[49]
Fe ₃ O ₄ -CS-Au y GOx inmovilizadas en CPE	$0,0356 \mu\text{Acm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$	$0,55 \times 10^{-3}$	$(5,0 - 30,0) \times 10^{-3}$	0,9971	Pérdida del 4,86% a los 15 días (4°C)	[59]
GOx/Ag@MWCNT-IL-Fe ₃ O ₄ /MGCE	$22,26 \mu\text{A mM}^{-1}$	$0,00212 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-3}$	N/D	93% después de 2 semanas (4°C)	[60]
GCE/Magnetita/PD A/AOX	$0,82 \pm 0,03 \mu\text{A/mM}$	$0,93 \times 10^{-3}$	N/D	N/D	N/D	[61]
GOx-SiO ₂ /Lig/CPE	$0,78 \mu\text{A mM}^{-1}$	145×10^{-6}	$(0,5 - 9,0) \times 10^{-3}$	0,999	82% después de 2 semanas (4°C)	[62]
GOD/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ /MWNTs/GC	N/D	$8,0 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-2}$	0,99994	N/D	[63]
GOx/mNPs@C/CPE	$(1,62 \pm 0,05) \times 10^5 \text{ nA M}^{-1}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-4} - 7,5 \times 10^{-3}$	0,9992	100% después de 100 días (4°C)	Este trabajo

N/D: información no disponible

GOx/GOD: Glucosa oxidasa; Fe₃O₄: NPs de magnetita; Fe: nanopartículas de hierro obtenidas por reducción térmica de nanopartículas de goetita; Fe₃O₄@SiO₂: nanopartículas de magnetita recubiertas de SiO₂; mNPs@C: nanopartículas de magnetita recubiertas de carbono; BQ:1,4-Benzoquinona; CPE: electrodo de pasta de carbono; CPEE: electrodo de pasta de carbono enzimático (GOD); MWNTs/MWCNT: nanotubos de carbono de pared múltiple; GC/GCE: electrodos de carbono vítrio; Ag: nanopartículas de plata; IL: amina-IL; PDA: polidopamina; AOX: alcohol oxidasa; SiO₂/Lig: híbrido de SiO₂ y lignina.

3.3.4-B. Estudio de interferentes

Un aspecto muy importante a tener en cuenta en el desarrollo de un biosensor es la selectividad hacia el analito de interés en presencia de otros compuestos que pueden formar parte de posibles muestras reales. Como se mencionó anteriormente, el ácido úrico (AU) y el ascórbico (AA) son interferentes comunes en la determinación de glucosa, debido a que son compuestos fácilmente oxidables que se encuentran en una variedad de fluidos biológicos. Por este motivo se analizó el comportamiento de AA y AU bajo las mismas condiciones de determinación de glucosa sobre GOx/mNPs@C/CPE.

En la **Figura 3-15** se muestran los perfiles de amperométricos para 5%GOx/10%mNPs@C/CPE obtenidos al realizar una adición de glucosa $5,0 \times 10^{-4}$ M y posteriormente 10 agregados sucesivos de AA $2,0 \times 10^{-5}$ M (**a**) y AU $4,0 \times 10^{-5}$ M (**b**), hasta llegar a una concentración final de AA $2,0 \times 10^{-4}$ M (**a**) y AU $4,0 \times 10^{-4}$ M (**b**). Como se puede observar, la interferencia es nula, puesto que no se aprecian cambios en la corriente ante los agregados de estos compuestos aun cuando la concentración supera los niveles máximos fisiológicos para AA (2,00 mg/dL o $1,14 \times 10^{-4}$ M) y AU (6,50 mg/dL o $3,86 \times 10^{-4}$ M) en sangre.

Estos resultados demuestran las ventajas de la utilización del nanomaterial catalítico para la detección altamente sensible y selectiva del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente.

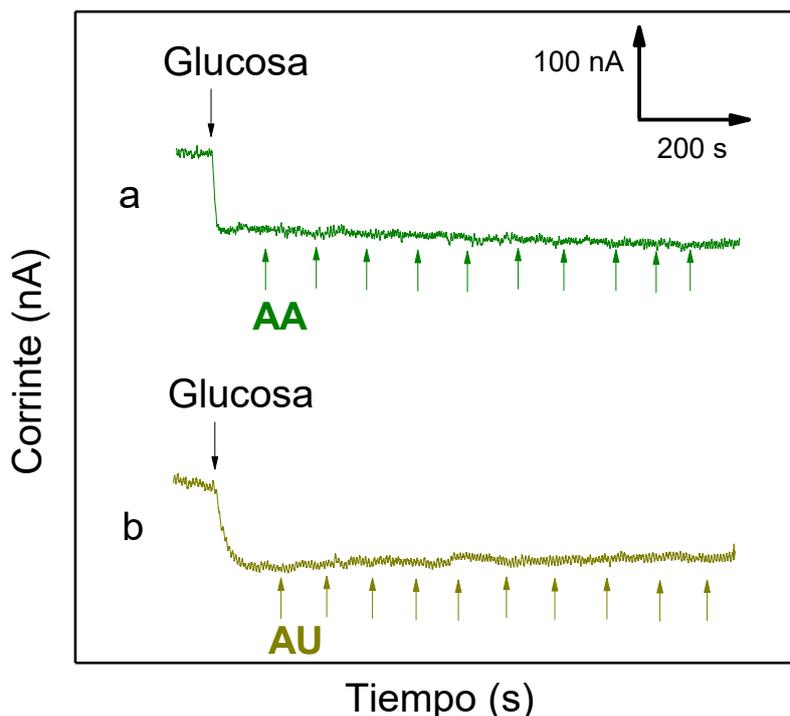


Figura 3-15. Registros amperométricos a $-0,100$ V para una adición de glucosa $5,0 \times 10^{-4}$ M obtenidas sobre 5%GOx/10%mNPs@C/CPE. Seguida de 10 agregados sucesivos de AA $2,0 \times 10^{-5}$ M (a) y AU $4,0 \times 10^{-5}$ M (b). Electrolito soporte: *buffer* fosfato $0,050$ M, pH $7,40$. Potencial de trabajo: $-0,100$ V.

3.3.4-C. Determinación de parámetros cinéticos

El proceso de inmovilización de una enzima generalmente altera el microambiente del sitio activo enzimático. Asimismo, al incorporar la GOx en la matriz compósito se pueden alterar las características intrínsecas de la misma. De esta forma la actividad enzimática está fuertemente influenciada por su entorno. En este sentido, no son deseables para tales aplicaciones matrices de electrodos altamente hidrofóbicas o totalmente hidrofílicas. Una matriz de CPE corresponde a un entorno ciertamente hidrofóbico, así la enzima incorporada podría alterar su conformación para exponer los residuos hidrofóbicos y, por consiguiente, su sitio activo podría ser más o menos accesible al sustrato. Asimismo, la difusión del analito hacia el nanomaterial catalítico también podría verse afectada por el ambiente circundante [49].

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de GOx en la matriz 5%GOx/10%*mNPs@C/CPE*, se llevó a cabo el análisis de los parámetros cinéticos del bioelectrodo. En este sentido, se evaluaron la corriente máxima (I_{max}) y constante de Michaelis-Menten aparente (K_m^{app}), que fueron calculadas a partir del gráfico de Eadie-Hofstee obtenido de la linealización de la curva de calibración para glucosa mostrada en la figura insertada en la **Figura 3-11.B**. Según la **ecuación 1-2** [52–55].

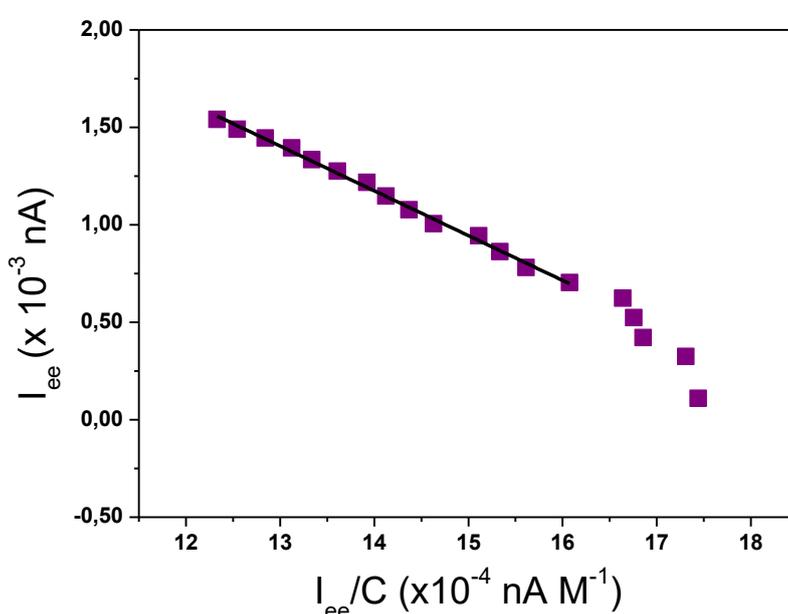


Figura 3-16. Gráfico de Eadie-Hofstee obtenido a partir de los correspondientes registros amperométricos para agregados de glucosa $6,25 \times 10^{-4}$ sobre 10%*mNPs@C/CPE*. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. Potencial de trabajo: -0,100 V.

Por consiguiente, a partir de la porción lineal del gráfico representado en la **Figura 3-16** se obtuvieron los siguientes valores: K_m^{app} : $(22,98 \pm 0,04) \times 10^{-3}$ M y I_{max} : $(4,39 \pm 0,06) \times 10^3$ nA. Teniendo en cuenta que los valores de K_m para GOx en solución oscilan entre 20 y 100×10^{-3} M [56], el valor obtenido sugiere que la inmovilización de GOx no provoca cambios apreciables en la afinidad de la enzima por su sustrato. Adicionalmente, el valor K_m^{app} obtenido tiene un valor similar al informado para GOx en una matriz de carbono $(20 \pm 2) \times 10^{-3}$ M [57] y a otros

valores reportados en bibliografía para matrices de diferente naturaleza [34,50,58].

Estos resultados sugieren que la matriz mNPs@C/CPE provee un microambiente apropiado para que la enzima mantenga su actividad biocatalítica, sin alterar el sitio activo de GOx.

En conclusión, si bien GOx está incluida en una matriz hidrofóbica, de micropartículas de carbono aglutinadas con aceite mineral, los parámetros cinéticos obtenidos así como el tiempo de respuesta del biosensor confirman que el microambiente no afecta significativamente la afinidad de la enzima inmovilizada por el sustrato. Esta observación demuestra que los problemas de difusión son superados incluso en el entorno circundante de la enzima de carácter ciertamente hidrofóbico.

3.3.5. Estabilidad de la plataforma

Otro parámetro analítico importante a determinar es la estabilidad de GOx/mNPs@C/CPE. Para ello, se investigó el desempeño del biosensor evaluando la sensibilidad para calibrados de glucosa a -0,100 V sobre la misma superficie y superficies diferentes a través del tiempo.

Por un lado, se estudió la estabilidad a corto plazo efectuando diez amperometrías sucesivas sobre la misma superficie GOx/mNPs@C/CPE. Los resultados arrojaron una excelente estabilidad, con un RSD 1,20 %. Por otro lado, se evaluó la estabilidad a largo plazo a partir de los valores de sensibilidad obtenidos de experimentos amperométricos diarios sobre el biosensor, realizados con diferentes superficies de GOx/mNPs@C/CPE (empleando el mismo compósito), durante un período de 15 días, almacenando el compósito a 4°C luego de cada experimento. Cabe destacar, además, que la respuesta del biosensor fue

periódicamente evaluada manteniéndose en un 100 % la respuesta inicial aún luego de 100 días transcurridos desde la preparación del biocompósito, demostrando una excelente estabilidad operacional. Estas evidencias reafirman aún más que mNPs@C/CPE provee un microambiente adecuado para preservar la actividad biocatalítica de la enzima.

3.3.6. Aplicación de GOx/mNPs@C/CPE

El biosensor fue empleado para la determinación de glucosa en dos muestras de suero liofilizado de sangre humana, Standartrol N1 y N2 (Wiener Lab.). En consecuencia, se realizaron determinaciones por quintuplicado para cada muestra con la plataforma 5%GOx/10%mNPs@C/CPE. Los valores obtenidos se muestran en la **tabla 3-4**.

Tabla 3-4. Determinación de glucosa en muestras de suero (N1 y N2) obtenidos con 5%GOx/10%mNPs@C/CPE y comparación con los valores informados.

Muestra	Valor informado por Wiener Lab.	Valor obtenido con 5%GOx/10%mNPs@C/CPE	Error
N1	89 mg/dL	(91,6 ± 0,4) mg/dL	+2,8 %
N2	238 mg/dL	(232 ± 6) mg/dL	-2,6 %

Como se puede observar para N1 se obtuvo un valor de (91,6 ± 0,4) mg/dL y para N2 un valor de (232 ± 6) mg/dL, mientras que los valores reportados por el laboratorio fabricante son 89 mg/dL y 238 mg/dL para N1 y N2, respectivamente. Por lo tanto, la metodología propuesta para la detección de glucosa no sólo se

realiza de manera altamente sensible sino que también permite la cuantificación en muestras reales con un alto grado de precisión y exactitud.

3.4. Conclusiones

Mediante un método sumamente sencillo, práctico y económico se logró sintetizar nanopartículas de magnetita inmersas en carbono amorfo, las cuales demostraron tener excelentes propiedades electrocatalíticas hacia la reducción de peróxido de hidrógeno.

La incorporación de glucosa oxidasa en una matriz compósito conteniendo las mNPs@C sintetizadas permitió el desarrollo exitoso de un biosensor para la cuantificación de glucosa.

Gracias a la amplificación de la señal proporcionada por mNPs@C y su actividad intrínseca similar peroxidasa se logró cuantificar glucosa a potenciales tales (-0,100 V) que permiten evitar la interferencia de compuestos fácilmente oxidables que están presentes en matrices complejas como suero sanguíneo humano.

Se logró determinar exitosamente glucosa en muestras de suero humano con una excelente correlación respecto a los valores informados por el laboratorio fabricante.

3.5. Bibliografía

- [1] D.L. Leslie-Pelecky, R.D. Rieke, Magnetic properties of nanostructured materials, *Chem. Mater.* 8 (1996) 1770–1783. doi:10.1021/cm960077f.
- [2] B.K. Sodipo, A.A. Aziz, Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica, *J. Magn. Magn. Mater.* 416 (2016) 275–291. doi:10.1016/j.jmmm.2016.05.019.
- [3] R.B. Nasir Baig, R.S. Varma, Organic synthesis via magnetic attraction: Benign and sustainable protocols using magnetic nanoferrites, *Green Chem.* 15 (2013) 398–417. doi:10.1039/c2gc36455g.
- [4] I. Mohmood, C.B. Lopes, I. Lopes, I. Ahmad, A.C. Duarte, E. Pereira, Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 1239–1260. doi:10.1007/s11356-012-1415-x.
- [5] L. Mohammed, H.G. Gomaa, D. Ragab, J. Zhu, Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review, *Particuology.* 30 (2017) 1–14. doi:10.1016/j.partic.2016.06.001.
- [6] B.K. Lim, E.C. Tighe, S.D. Kong, The use of magnetic targeting for drug delivery into cardiac myocytes, *J. Magn. Magn. Mater.* 473 (2019) 21–25. doi:10.1016/j.jmmm.2018.09.118.
- [7] M. Youhannayee, S. Nakhaei-Rad, F. Haghighi, K. Klauke, C. Janiak, M.R. Ahmadian, R. Rabenalt, P. Albers, M. Getzlaff, Physical characterization and uptake of iron oxide nanoparticles of different prostate cancer cells, *J. Magn. Magn. Mater.* 473 (2019) 205–214. doi:10.1016/j.jmmm.2018.10.062.
- [8] L. Barbosa-Barros, S. García-Jimeno, J. Estelrich, Formation and characterization of biobased magnetic nanoparticles double coated with dextran and chitosan by layer-by-layer deposition, *Colloids Surfaces A*

- Physicochem. Eng. Asp. 450 (2014) 121–129.
doi:10.1016/j.colsurfa.2014.03.004.
- [9] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Magnetic Nanoparticles Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications, Am. Chem. Soc. 112 (2012) 5818–5878.
doi:10.1021/cr300068p.
- [10] Ł. Klapiszewski, J. Zdarta, K. Anteck, K. Synoradzki, K. Siwińska-Stefańska, D. Moszyński, T. Jesionowski, Magnetite nanoparticles conjugated with lignin: A physicochemical and magnetic study, Appl. Surf. Sci. 422 (2017) 94–103.
doi:10.1016/j.apsusc.2017.05.255.
- [11] M. Arana, S.E. Jacobo, H. Troiani, P.G. Bercoff, Synthesis and characterization of carbon-coated magnetite for functionalized ferrofluids, IEEE Trans. Magn. 49 (2013) 4547–4550. doi:10.1109/TMAG.2013.2259805.
- [12] C. Suryanarayana, Mechanical alloying and milling, Prog. Mater. Sci. 46 (2001) 1–184. doi:10.1016/S0079-6425(99)00010-9.
- [13] H. Wei, E. Wang, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6060–6093. doi:10.1039/c3cs35486e.
- [14] Y. Lin, J. Ren, X. Qu, Catalytically Active Nanomaterials: A Promising Candidate for Artificial Enzymes, Acc. Chem. Res. 47 (2013) 1097–1105.
doi:10.1021/ar400250z.
- [15] J. Wu, S. Li, H. Wei, Multifunctional nanozymes: Enzyme-like catalytic activity combined with magnetism and surface plasmon resonance, Nanoscale Horizons. 3 (2018) 367–382. doi:10.1039/c8nh00070k.
- [16] Solids Go Bio: Inorganic Nanoparticles as Enzyme Mimics, Eur. J. Inorg. Chem. (2016) 1906–1915. doi:10.1002/ejic.201600408.

-
- [17] A. Nsabimana, S.A. Kitte, F. Wu, L. Qi, Z. Liu, M.N. Zafar, R. Luque, G. Xu, Multifunctional magnetic Fe₃O₄/nitrogen-doped porous carbon nanocomposites for removal of dyes and sensing applications, *Appl. Surf. Sci.* 467–468 (2019) 89–97. doi:10.1016/j.apsusc.2018.10.119.
- [18] J. Guo, Y. Wang, M. Zhao, 3D flower-like ferrous(II) phosphate nanostructures as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose at nanomolar level, *Talanta*. 182 (2018) 230–240. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.080.
- [19] Q. Wang, H. Wei, Z. Zhang, E. Wang, S. Dong, Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 218–224. doi:10.1016/j.trac.2018.05.012.
- [20] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 577–583. doi:10.1038/nnano.2007.260.
- [21] Q. Wang, X. Zhang, L. Huang, Z. Zhang, S. Dong, One-Pot Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticle Loaded 3D Porous Graphene Nanocomposites with Enhanced Nanozyme Activity for Glucose Detection, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 7465–7471. doi:10.1021/acsami.6b16034.
- [22] S. Liu, F. Lu, R. Xing, J.-J. Zhu, Structural Effects of Fe₃O₄ Nanocrystals on Peroxidase-Like Activity, *Chem. - A Eur. J.* 17 (2011) 620–625. doi:10.1002/chem.201001789.
- [23] Y. Zhou, B. Liu, R. Yang, J. Liu, Filling in the Gaps between Nanozymes and Enzymes: Challenges and Opportunities, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 2903–2909. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00673.
- [24] L.C. Clarck, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann N Y Acad Sci.* 102 (1962) 3129–3145.

doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.

- [25] E. Malel, D. Mandler, Direct Electron Transfer between Glucose Oxidase and Gold Nanoparticles; When Size Matters, *ChemElectroChem* 6 (2019) 147–154. doi:10.1002/celec.201801091.
- [26] Q. Gao, Y. Guo, W. Zhang, H. Qi, C. Zhang, An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 153 (2011) 219–225. doi:10.1016/j.snb.2010.10.034.
- [27] R.M. Pemberton, J. Xu, R. Pittson, G.A. Drago, J. Griffiths, S.K. Jackson, J.P. Hart, A screen-printed microband glucose biosensor system for real-time monitoring of toxicity in cell culture, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2448–2453. doi:10.1016/j.bios.2010.10.030.
- [28] H.P. Song, Y. Lee, V.K.H. Bui, Y.K. Oh, H.G. Park, M. Il Kim, Y.C. Lee, Effective peroxidase-like activity of co-aminoclay [COAC] and its application for glucose detection, *Sensors* 18 (2018) 1–12. doi:10.3390/s18020457.
- [29] F.N. Comba, M.R. Romero, F.S. Garay, A.M. Baruzzi, Mucin and carbon nanotube-based biosensor for detection of glucose in human plasma, *Anal. Biochem.* 550 (2018) 34–40. doi:10.1016/j.ab.2018.04.006.
- [30] C. Hsu, G. Wang, Highly sensitive glucose biosensor based on Au – Ni coaxial nanorod array having high aspect ratio, *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 204–209. doi:10.1016/j.bios.2014.01.023.
- [31] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, Electrochemical nanobiosensing in whole blood: Recent advances, *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 167–176. doi:10.1016/j.trac.2015.07.018.
- [32] Y. Piao, D.J. Han, T.S. Seo, Highly conductive graphite nanoparticle based enzyme biosensor for electrochemical glucose detection, *Sensors Actuators,*

-
- B Chem. 194 (2014) 454–459. doi:10.1016/j.snb.2013.12.045.
- [33] Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A.J. Flewitt, F. Moussy, Y. Li, W.I. Milne, Design of carbon nanotube fiber microelectrode for glucose biosensing, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87 (2012) 256–262. doi:10.1002/jctb.2708.
- [34] A. Jędrzak, T. Rębiś, M. Nowicki, K. Synoradzki, R. Mrówczyński, T. Jesionowski, Polydopamine grafted on an advanced Fe₃O₄/lignin hybrid material and its evaluation in biosensing, *Appl. Surf. Sci.* 455 (2018) 455–464. doi:10.1016/j.apsusc.2018.05.155.
- [35] G.L. Luque, M.C. Rodríguez, G.A. Rivas, Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix, *Talanta.* 66 (2005) 467–471. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.019.
- [36] F.N. Comba, M.D. Rubianes, P. Herrasti, G.A. Rivas, Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles, *Sensors Actuators, B Chem.* 149 (2010) 306–309. doi:10.1016/j.snb.2010.06.020.
- [37] B. Yuan, C. Xu, D. Deng, Y. Xing, L. Liu, H. Pang, D. Zhang, Graphene oxide/nickel oxide modified glassy carbon electrode for supercapacitor and nonenzymatic glucose sensor, *Electrochim. Acta.* 88 (2013) 708–712. doi:10.1016/j.electacta.2012.10.102.
- [38] Q. Liu, Y. Yang, X. Lv, Y. Ding, Y. Zhang, J. Jing, C. Xu, One-step synthesis of uniform nanoparticles of porphyrin functionalized ceria with promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose colorimetric detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 240 (2017) 726–734. doi:10.1016/j.snb.2016.09.049.
- [39] Y. Ding, M. Chen, K. Wu, M. Chen, L. Sun, Z. Liu, Z. Shi, Q. Liu, High-performance peroxidase mimics for rapid colorimetric detection of H₂O₂ and glucose derived from perylene diimides functionalized Co₃O₄ nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C.* 80 (2017) 558–565. doi:10.1016/j.msec.2017.06.020.

- [40] A.X. Zheng, Z.X. Cong, J.R. Wang, J. Li, H.H. Yang, G.N. Chen, Highly-efficient peroxidase-like catalytic activity of graphene dots for biosensing, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 519–524. doi:10.1016/j.bios.2013.05.038.
- [41] F. Khodadadei, H. Ghourchian, M. Soltanieh, M. Hosseinalipour, Y. Mortazavi, Rapid and clean amine functionalization of carbon nanotubes in a dielectric barrier discharge reactor for biosensor development, *Electrochim. Acta.* 115 (2014) 378–385. doi:10.1016/j.electacta.2013.10.039.
- [42] L. Takacs, Self-sustaining reactions induced by ball milling, *Prog. Mater. Sci.* 47 (2002) 355–414. doi:10.1016/S0079-6425(01)00002-0.
- [43] M. Hisa, A. Tsutsumi, T. Akiyama, Materialographic investigation on the mechanism of hydrogen production through the reaction between iron carbide and steam at a temperature of 673 K, *Mater. Trans.* 45 (2004) 1911–1914. doi:10.1016/B978-0-444-53870-3.00021-6.
- [44] Ariel Orazzi, Desarrollan biosensores con nanopartículas para detectar glucosa en sangre, UNCIENCIA-Universidad Nac. Córdoba. [Http://Www.Unciencia.Unc.Edu.Ar/2014/Diciembre/Desarrollan-Biosensores-Con-Nanoparticulas-Para-Detectar-Glucosa-En-Sangre](http://www.unciencia.unc.edu.ar/2014/diciembre/Desarrollan-Biosensores-Con-Nanoparticulas-Para-Detectar-Glucosa-En-Sangre). (2014) 1–7.
- [45] V. Ganesan, C. Louis, S.P. Damodaran, Graphene oxide-wrapped magnetite nanoclusters: A recyclable functional hybrid for fast and highly efficient removal of organic dyes from wastewater, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 2176–2190. doi:10.1016/j.jece.2018.03.026.
- [46] X. Niu, Y. Xu, Y. Dong, L. Qi, S. Qi, H. Chen, X. Chen, Visual and quantitative determination of dopamine based on $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics, *J. Alloys Compd.* 587 (2014) 74–81. doi:10.1016/j.jallcom.2013.10.089.

-
- [47] P.E. Erden, B. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, E. Kiliç, Amperometric carbon paste enzyme electrodes with Fe₃O₄ nanoparticles and 1,4-Benzoquinone for glucose determination, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 41 (2013) 165–171. doi:10.3109/10731199.2012.712045.
- [48] K.V.S. Ranganath, F. Glorius, Superparamagnetic nanoparticles for asymmetric catalysis - A perfect match, *Catal. Sci. Technol.* 1 (2011) 13–22. doi:10.1039/c0cy00069h.
- [49] F.N. Comba, M.D. Rubianes, L. Cabrera, S. Gutiérrez, P. Herrasti, G.A. Rivas, Highly Sensitive and selective glucose biosensing at carbon paste electrodes modified with electrogenerated magnetite nanoparticles and glucose oxidase, *Electroanalysis*. 22 (2010) 1566–1572. doi:10.1002/elan.200900566.
- [50] M.C. Rodriguez, G.A. Rivas, Glucose biosensor prepared by the deposition of iridium and glucose oxidase on glassy carbon transducer, *Electroanalysis* 11 (1999) 558–564. doi:10.1002/(SICI)1521-4109(199906)11:8<558::AID-ELAN558>3.0.CO;2-N.
- [51] X. Zhang, H. Ju, J. Wang, *Electrochemical Sensors, Biosensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, 2007.
- [52] Y. Nakabayashi, M. Wakuda, H. Imai, Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer, *Anal. Sci.* 14 (1998) 1069–1076. doi:10.1109/CMSP.2011.155.
- [53] A. Amine, J.M. Kauffmann, G.G. Guilbault, S. Bacha, Characterization of Mixed Enzyme-Mediator-Carbon Paste Electrodes, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1281–1299. doi:10.1080/00032719308017413.
- [54] Y. Wang, Y. Zhu, J. Chen, Y. Zeng, Amperometric biosensor based on 3D ordered freestanding porous Pt nanowire array electrode, *Nanoscale*. 4

- (2012) 6025. doi:10.1039/c2nr31256e.
- [55] S. Idris, N.H. Azeman, N.A. Noor Azmy, C.T. Ratnam, M.A. Mahdi, A.A. Ahmad, Gamma irradiated Py/PVA for GOx immobilization on tapered optical fiber for glucose biosensing, *Sensors Actuators, B Chem.* 273 (2018) 1404–1412. doi:10.1016/j.snb.2018.07.053.
- [56] Y. Wang, Y. Zhu, J. Chen, Y. Zeng, Amperometric biosensor based on 3D ordered freestanding porous Pt nanowire array electrode, *Nanoscale* 4 (2012) 6025–31. doi:10.1039/c2nr31256e.
- [57] R.A. Kamin, Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer, *Anal. Chem.* (1980) 1198–1205.
- [58] H. Teymourian, A. Salimi, S. Khezrian, Fe₃O₄magnetic nanoparticles/reduced graphene oxide nanosheets as a novel electrochemical and bioelectrochemical sensing platform, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 1–8. doi:10.1016/j.bios.2013.04.034.
- [59] A. Onay, Ü. Dogan, H. Ciftci, D. Cetin, Z. Suludere, U. Tamer, Amperometric glucose sensor based on the glucose oxidase enzyme immobilized on graphite rod electrode modified with Fe₃O₄-CS-Au magnetic nanoparticles, *Ionics (Kiel)*. (2018) 1–8. doi:10.1007/s11581-018-2559-6.
- [60] M. Baghayeri, H. Veisi, M. Ghanei-Motlagh, Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a magnetic glassy carbon electrode modified with a novel magnetic nanocomposite, *Sensors Actuators, B Chem.* 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.snb.2017.04.100.
- [61] J. Jaime, G. Rangel, A. Muñoz-Bonilla, A. Mayoral, P. Herrasti, Magnetite as a platform material in the detection of glucose, ethanol and cholesterol, *Sensors Actuators, B Chem.* 238 (2017) 693–701. doi:10.1016/j.snb.2016.07.059.

-
- [62] A. Jędrzak, T. Rębiś, Ł. Klapiszewski, J. Zdarta, G. Milczarek, T. Jesionowski, Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 256 (2018) 176–185. doi:10.1016/j.snb.2017.10.079.
- [63] Tessy Theres Baby, S. Ramaprabhu, SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor, *Talanta* 80 (2010) 2016–2022.

Capítulo 4

Sensor amperométrico para la
cuantificación no enzimática de
etanol basado en el empleo de
nanohilos de níquel

Capítulo 4

4.1. Introducción

Dentro del universo de los NMs los nanohilos (NWs) son excelentes candidatos para el diseño de sensores de nueva generación debido a las numerosas ventajas que exhiben como su alta relación superficie/volumen y la relativa facilidad que presentan para ser incorporados en dispositivos microelectrónicos [1–3]. Los NWs son estructuras anisotrópicas unidimensionales (1-D), de forma cilíndrica, completamente macizos y con un diámetro pequeño. Si bien la definición de NMs comprende estructuras de tamaño entre 1 y 100 nm, en ciertas ocasiones pueden sobrepasar estas dimensiones, como es el caso de los NWs. Los cuales pueden tener un diámetro que va entre unas pocas decenas de nanómetros hasta 500 nm y una longitud considerable que puede llegar a unos cuantos micrómetros [2,4]. Las características antes mencionadas los hacen únicos en lo que respecta a otras nanoestructuras, ya que por ejemplo pueden ser diseñados y fabricados con diferentes segmentos metálicos para controlar su funcionalidad química y magnética [5,6]. Otra aplicación que despierta gran interés, es que pueden ser utilizados como elementos de cableado para la construcción de dispositivos nano-bioelectrónicos [7,8].

Los NWs pueden ser sintetizados a partir de una amplia variedad de materiales. Los más relevantes y ampliamente difundidos son sintetizados a partir de polímeros y metales [2]. En este capítulo la discusión estará centrada en los nanohilos de origen metálico, en especial los NWs de níquel.

Los NWs metálicos son nanoestructuras metálicas o semiconductoras que pueden sintetizarse empleando distintos constituyentes, tales como cobre, oro, níquel, plata, óxidos metálicos, entre otros; y además pueden fabricarse con

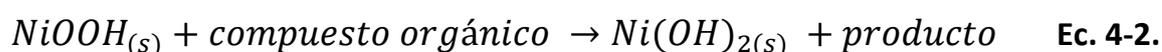
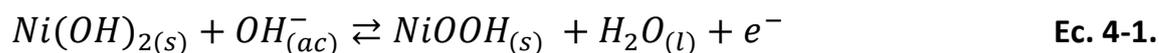
diferentes composiciones (bi, tri-metálicos, etc.) de acuerdo con los materiales constituyentes que posean. Asimismo, conforme a la estructura obtenida, pueden ser segmentados, si los metales se disponen uno a continuación del anterior, o ser aleaciones si se efectúa una co-deposición de dos metales simultáneamente. En estos casos es posible controlar la funcionalidad específica de cada segmento o de la nanoestructura completa [5,9–13].

Tal como se indicó en el **Capítulo 1** el empleo de nanomateriales en sensores y biosensores presenta múltiples ventajas relacionadas con las excelentes propiedades ópticas y electrónicas que poseen. En el caso específico del empleo de NWs en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos, la principal ventaja que se puede destacar es el gran incremento del área superficial que mejora el desempeño electroanalítico. Esta característica contribuye a disminuir los potenciales de oxidación y reducción de ciertos analitos, ya que aumenta la eficiencia en la electrocatálisis; la obtención de elevadas corrientes, lo cual lleva a un aumento en la sensibilidad analítica. Asimismo, los NWs presentan alta estabilidad y resistencia a la pasivación, lo que conduce a una mejora en la reproducibilidad. Además, los NWs presentan una interesante compatibilidad y funcionalidad con biomoléculas, debido a las diferentes estrategias de síntesis posibles, lo que facilita la inmovilización de éstas sobre los nanomateriales [2].

Es interesante destacar, que merced a las ventajosas propiedades que exhiben los NWs metálicos, una gran variedad de moléculas inorgánicas y orgánicas (peróxido de hidrogeno, alcoholes, carbohidratos, drogas, entre otras) pueden ser electro-oxidados o electro-reducidos por NWs metálicos y por lo tanto, se los puede emplear para aumentar la eficiencia en las estrategias de cuantificación [14–18].

Se ha reportado el empleo de materiales de níquel con actividad electrocatalítica hacia compuestos orgánicos [18–23]. En la década del setenta Fleishmann y colaboradores fueron pioneros en el estudio de los mecanismos,

cinética y oxidación de compuestos orgánicos (en particular aminas y alcoholes) sobre electrodos de níquel [24]. En los años subsiguientes muchos grupos de investigación desarrollaron distintos tipos de plataformas basadas en el principio descrito por Fleishmann, donde un compuesto orgánico es oxidado sobre un electrodo de níquel, según las siguientes reacciones:



La **ecuación 4-1** describe la oxidación de Ni(II) a Ni(III), en medio alcalino, mediante la aplicación de un potencial anódico, es decir la formación de oxihidróxido de níquel (NiOOH) a partir de la especie reducida, el hidróxido de níquel (Ni(OH)₂). De la misma manera, si se aplica un potencial catódico, o sea en el sentido inverso, ocurre la reacción de reducción de NiOOH a Ni(OH)₂ [23,25,26].

Por otro lado, tal como se describe en la **ecuación 4-2**, cuando un compuesto orgánico está presente en la solución y se aplica un potencial de modo que se forme el NiOOH, ocurrirá una reacción química donde el compuesto orgánico se oxidará y el NiOOH se reducirá, dando como producto Ni(OH)₂ nuevamente sobre la superficie del electrodo. De esta manera, el sistema se retroalimenta generándose un ciclo catalítico y por lo tanto, se incrementa la señal de oxidación, y en consecuencia el rendimiento y la eficiencia para la cuantificación de los compuestos que pueden electro-oxidarse [27–29]. También es importante remarcar la resistencia al envenenamiento de la superficie y la estabilidad a largo plazo en medio alcalino. Estas características hacen que el Ni sea un excelente candidato para aplicaciones en electrocatálisis [18,30].

La electrodeposición de metales a través del método “template-guided” o mediado por moldes utilizando membranas de óxido de aluminio (Al_2O_3) anodizado (AAO) o membranas de policarbonato (PC), es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de NWs metálicos, debido a la simplicidad del proceso, alta relación rendimiento/costo y eficiencia en la síntesis de nanoestructuras anisotrópicas [31–35].

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la construcción y caracterización de una plataforma nanoestructurada con actividad electrocatalítica hacia la oxidación no enzimática de etanol. La plataforma se obtuvo al incluir nanohilos de níquel (NiNWs) en una matriz compósito de micropartículas de grafito, como material conductor y aceite mineral como agente aglutinante (CPE). Los NiNWs se obtuvieron por deposición electroquímica utilizando membranas de AAO comerciales. Una vez sintetizados, los NiNWs fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), emisión de rayos X (EDS) y difracción de rayos X (DRX). La plataforma obtenida (CPE-NiNWs) se estudió mediante las siguientes técnicas electroquímicas: voltamperometría cíclica (VC), amperometría (CA) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).

4.2. Metodología experimental

Para la síntesis de los NiNWs se emplearon membranas comerciales Whatman® de óxido de aluminio anodizado (AAO) de 25 mm de diámetro, 60 μm de espesor y un tamaño de poro nominal de 200 nm de diámetro. Para la solución de electrodeposición, preparada en ácido bórico (20 g/L, Biopack), se utilizaron las siguientes sales de níquel: cloruro de níquel (II) hexahidratado (20 g/L) y sulfamato de níquel (III) tetrahidratado (120 g/L), ambos de Sigma-Aldrich. Se utilizó alcohol etílico anhidro (99.88%) provisto por J.T. Baker.

Para la preparación de los compósitos se utilizó polvo de micropartículas de grafito (grado #38, Fischer Scientific) y aceite mineral como agente aglutinante de Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y se utilizaron sin ninguna purificación previa. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente. Como electrolito soporte se utilizó NaOH 0,10 M (Biopack). Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura deionizada (MQ, $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), la cual fue obtenida a través de un sistema Milli-Q de Millipore.

4.2.1. Síntesis de NiNW

Para fabricar los NiNWs se empleó la síntesis mediada por moldes o “*template-guided*” [31]. Este es un método ampliamente utilizado y de baja complejidad para la síntesis de nanoestructuras, ya que las membranas comerciales poseen una alta densidad de poros de diámetro conocido con distribución de forma y tamaño homogéneos, por lo tanto es posible obtener un elevado número de nanoestructuras en cada síntesis ($\sim 9 \times 10^9$ /membrana) [36]. En la **Figura 4-1.A** se muestra una foto de las membranas comerciales Whatman®, y en **B** una imagen SEM de la misma, donde se observa la distribución de poros de tamaño homogéneo.

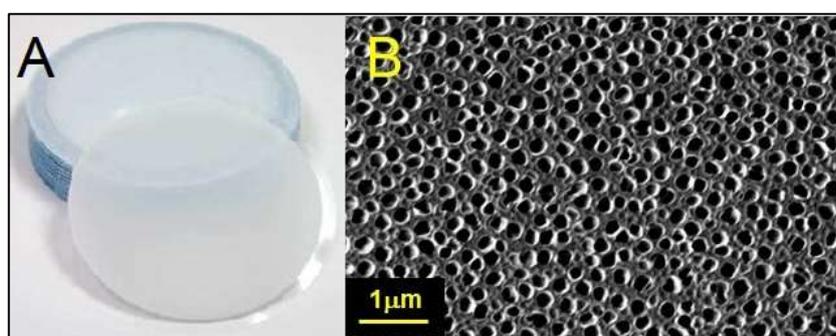


Figura 4-1. A. Membranas comerciales de AAO, B. Imagen SEM de la membrana. Magnificación 16000X.

Para que las membranas sean conductoras y puedan emplearse como un electrodo de trabajo, se siguió una estrategia de metalización en uno de sus lados, previo a la síntesis. Para ello se llevó a cabo un “*sputtering*”, utilizando cobre como metal de deposición, con el objetivo de obtener una película delgada de Cu de aproximadamente 85 nm de espesor.

La síntesis electroquímica de los NWs por electrodeposición, se realizó a través de la reducción de los iones de níquel en solución dentro de los poros de la membrana, en donde los cationes Ni²⁺ se reducen a níquel metálico, mediante la siguiente la reacción:



Para que ocurra este proceso se debe aplicar externamente un potencial catódico de mayor magnitud que el potencial estándar de reducción del metal [31,35], en este caso se utilizó un valor de potencial de -1,20 V, contra el electrodo de referencia Ag/AgCl/NaCl. La longitud de los nanohilos se controló monitoreando la carga de deposición. Los NiNWs sintetizados se depositaron hasta alcanzar una carga de 20 C para obtener la longitud deseada [31]. La **Figura 4-2** muestra el esquema de síntesis.

Luego de la electrodeposición, la capa de cobre fue removida empleando una solución de CuCl 0,50 M en HCl al 30%. Por último, la membrana de AAO, que posee los NiNWs incluidos en sus poros, se sumerge en una solución de NaOH 3,0 M para llevar a cabo la disolución completa del óxido de aluminio y liberar los NiNWs del molde de síntesis. Luego los NiNWs fueron lavados varias veces con agua ultrapura con el fin de eliminar el NaOH hasta alcanzar un valor de pH= 7,0 y posteriormente fueron almacenados en una dispersión acuosa, conteniendo $\sim 18.0 \times 10^9$ NiNWs/mL.

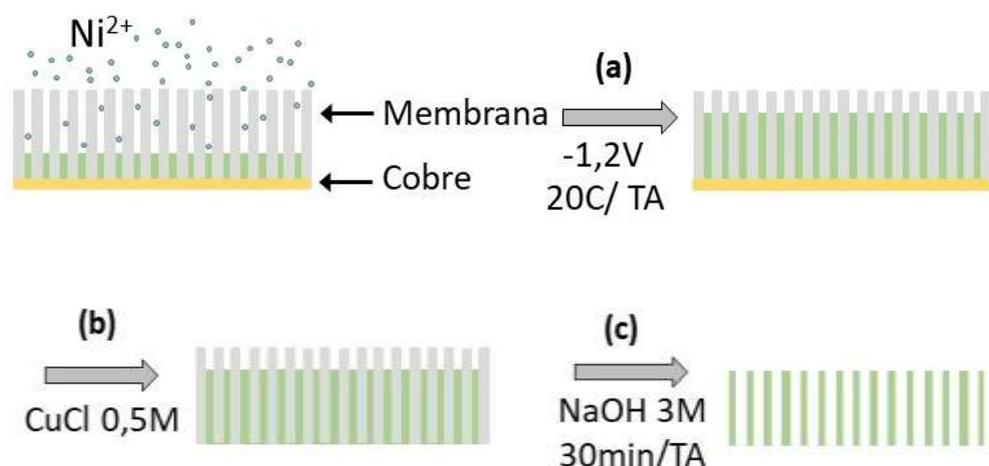


Figura 4-2. Esquema de síntesis de NiNWs **(a)** electrodeposición de iones níquel, **(b)** disolución de la capa de cobre, **(c)** disolución total de la membrana AAO y obtención de NiNWs en dispersión. Condiciones de síntesis: potencial aplicado $-1,20\text{ V}$, temperatura ambiente, hasta alcanzar una carga de 20 C .

4.2.2 Preparación de los electrodos de trabajo

Como electrodos de trabajo se utilizaron compósitos de pasta de carbono sin modificar (CPE) y modificada con diferentes proporciones de NiNWs (CPE/NiNWs). Los CPE fueron preparados mezclando mecánicamente polvo de grafito (70% P/P) y aceite mineral (30% P/P) en un mortero de ágata por 30 minutos. Los CPE/NiNWs se prepararon adicionando distintos volúmenes de la dispersión de NiNWs al polvo de grafito, esta mezcla se llevó a una temperatura controlada de 100°C durante 60 minutos, hasta la completa evaporación del agua. Luego se agregó el aceite mineral y se mezcló por 30 min. Las pastas resultantes fueron guardadas a temperatura ambiente.

Al momento de utilizar los compósitos, una pequeña porción de pasta fue embutida en un cuerpo cilíndrico de Teflon® con una cavidad de 3 mm de diámetro, estableciéndose el contacto eléctrico a partir de un tornillo metálico colocado en el extremo posterior del soporte hueco (como se muestra en el

capítulo 2). Antes de comenzar cada experimento la nueva superficie del electrodo de trabajo fue renovada por el pulido de éste sobre un papel liso convencional (70 g/m²).

Se prepararon tres electrodos de trabajo, con distintas proporciones de NiNWs:

- CPE 4.5M-NiNWs ($\sim 4,5 \times 10^6$ NiNWs/mg CPE),
- CPE 9.0M-NiNWs ($\sim 9,0 \times 10^6$ NiNWs/mg CPE),
- CPE 18.0M-NiNWs ($\sim 18,0 \times 10^6$ NiNWs/mg CPE).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Caracterización estructural de NiNWs

Los NiNWs en dispersión acuosa, fueron caracterizados por microscopía de barrido electrónico (SEM) y difracción de rayos X (DRX). La **Figura 4-3** corresponde a una imagen SEM de NiNWs sintetizados en membranas de AAO. En la **Figura 4-3.A** se muestra los NiNWs liberados luego de la disolución total de la membrana. A través de esta técnica se determinó que bajo estas condiciones, la síntesis es altamente reproducible y los NiNWs presentan un tamaño de 30 μm de largo y 200 nm de diámetro, con una distribución de forma y tamaño muy homogéneo.

En la **Figura 4-3. B y C** se muestran las imágenes SEM a diferentes magnificaciones de los NiNWs incluidos en la membrana parcialmente disuelta, demostrando que la síntesis fue exitosa ya que los NiNWs pudieron ser sintetizados uniformemente en la totalidad de los poros de la membrana.

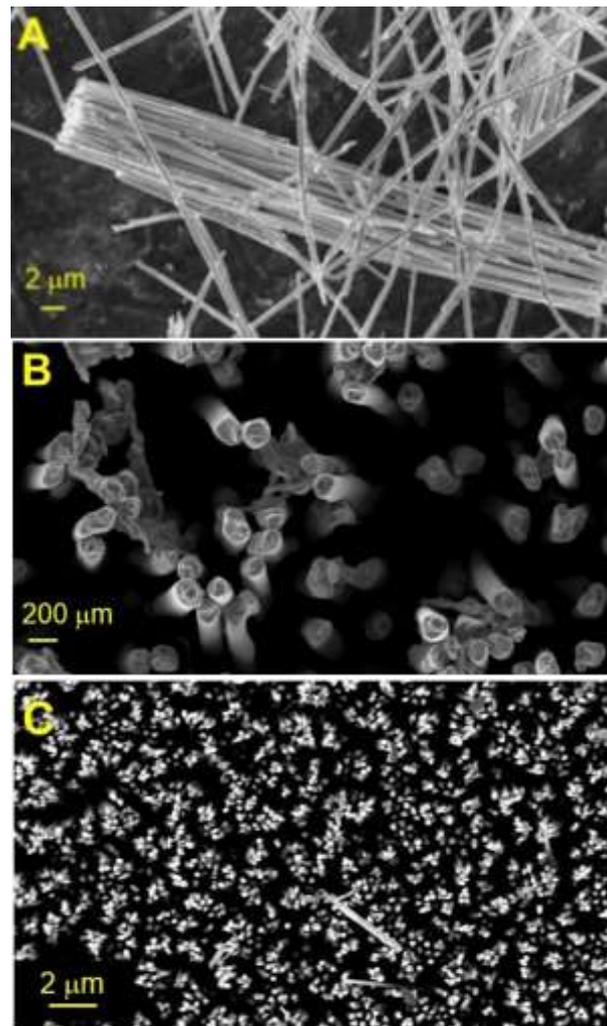


Figura 4-3. A. Imágenes SEM de los NiNWs sintetizados (Mag. 3200X). B y C. Vista superior de NiNWs incluidos en la membrana de AAO parcialmente disuelta (Mag. 23300X y 4600X respectivamente). Condiciones de síntesis: Figura 4-2.

Otra etapa de caracterización fue llevada a cabo mediante experimentos de DRX de los NiNWs una vez liberados del molde. En el difractograma que se muestra en la **Figura 4-4** se observan cuatro picos de mayor intensidad característicos de los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311), correspondientes a una estructura de Ni metálico cúbica centrada en las caras (fcc). Estos valores se corresponden con los informados de acuerdo con la tarjeta Nro. 04-0850 indexada por el Centro Internacional para Datos de Difracción (JCPDS, por sus siglas en inglés) [14,37]. Los resultados indican que los NiNWs presentan una estructura altamente cristalina sin trazas de óxido de níquel. Sin embargo, como puede observarse en el *figura*

insertada de la **Figura 4-4**, donde se muestra un barrido realizado en la zona comprendida entre 30 y 40 grados, se evidencia una pequeña señal asociada a la presencia de un muy bajo contenido de Ni(OH)_2 , probablemente producido durante el proceso de disolución de la membrana en NaOH 3,0 M. Este hallazgo es concordante con lo reportado por varios grupos de investigación, en referencia a la formación de una capa de Ni(OH)_2 , cuando el metal se pone en contacto con una solución acuosa alcalina [38–40].

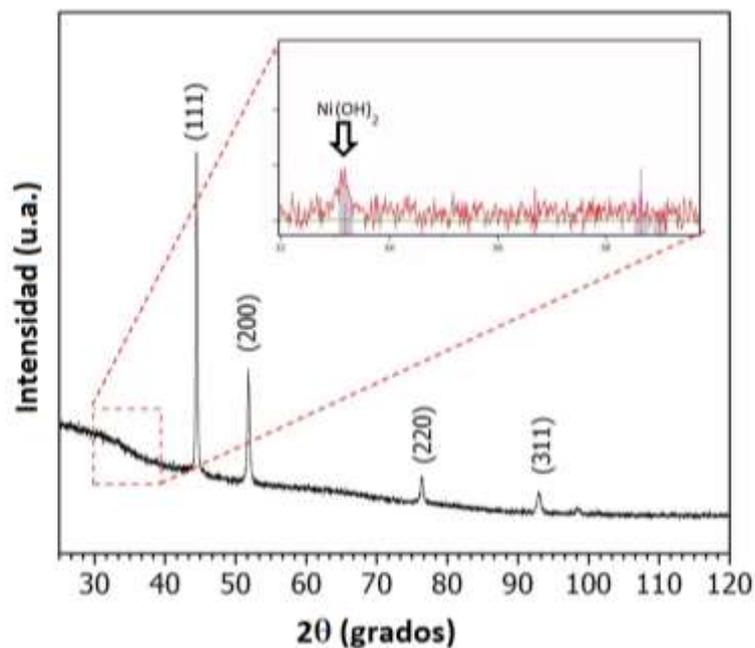


Figura 4-4. Patrón de DRX de los NiNWs sintetizados. **Figura insertada:** difractograma ampliado, entre 30 y 40 grados.

4.3.2. Caracterización superficial de los compósitos obtenidos

En la **Figura 4-5** se muestran imágenes SEM de electrones retrodispersados (ER) obtenidas de los compósitos modificados con distintas proporciones de NiNWs: **(a)** CPE 4.5M-NiNWs, **(b)** CPE 9.0M NiNWs y **(c)** CPE 18.0M-NiNWs. Estas imágenes SEM revelan que los NiNWs, que aparecen como elementos más

brillantes que la matriz de carbono (debido a que el Ni posee mayor número atómico que el C), están eficientemente atrapados en el compósito y se encuentran dispersos homogéneamente en toda la superficie del electrodo, incluso en el compósito que posee mayor contenido de nanoestructuras.

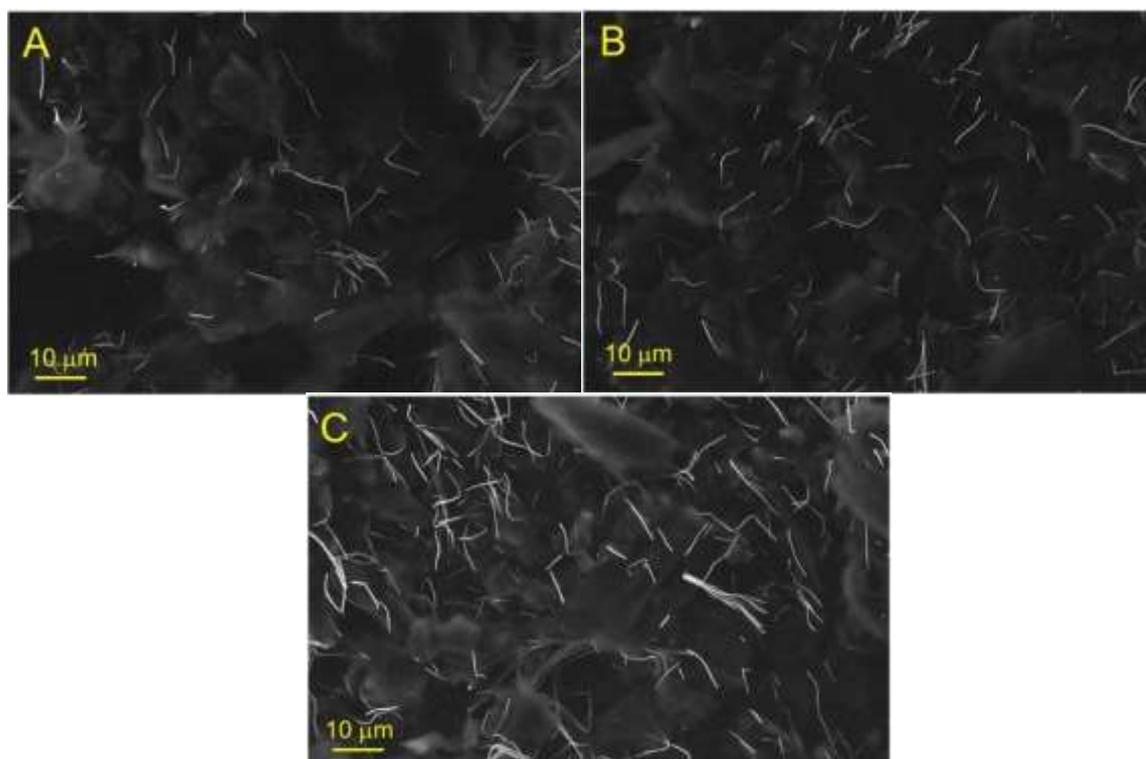


Figura 4-5. Imágenes SEM de electrones retrodispersados de los diferentes electrodos modificados con cantidad creciente de NiNWs: **(a)** CPE 4.5M-NiNWs (3200X), **(b)** CPE 9.0M-NiNWs y **(c)** CPE 18.0M-NiNWs. Magnificación: 1000X

Adicionalmente, se realizaron ensayos de emisión de rayos X (EDS) en distintas áreas puntuales de diferentes muestras, con el objetivo de determinar la composición elemental de las mismas. En la **Figura 4-6.A** se muestra una imagen representativa de electrones secundarios (ES) para CPE 18.0M-NiNWs a una mayor magnificación que la **Figura 4-5.C**, y en la **Figura 4-6.B** se puede observar el espectro de EDS correspondiente a la composición elemental de la imagen mostrada en **A**.

A partir de los espectros de rayos X obtenidos, el software del equipo de SEM integra los picos encontrados y los normaliza respecto al pico del elemento de mayor intensidad. Por lo cual, se puede realizar un análisis semicuantitativo de los espectros de EDS, como se muestra en el margen superior derecho de la **Figura 4-6.B**. Del análisis de estos datos, queda evidenciado que además del carbono correspondiente al compósito, que aparece en mayor proporción en este material, solo se detecta níquel y oxígeno en una relación atómica Ni:O de 100:22. Este resultado confirma que no hay impurezas remanentes luego de la síntesis y sugiere la presencia de una pequeña cantidad de óxido y/o hidróxido de níquel, lo que es consistente con los experimentos de DRX realizados a los NiNWs, previo a su incorporación en el compósito, mostrados en la **sección 4.3.1**.

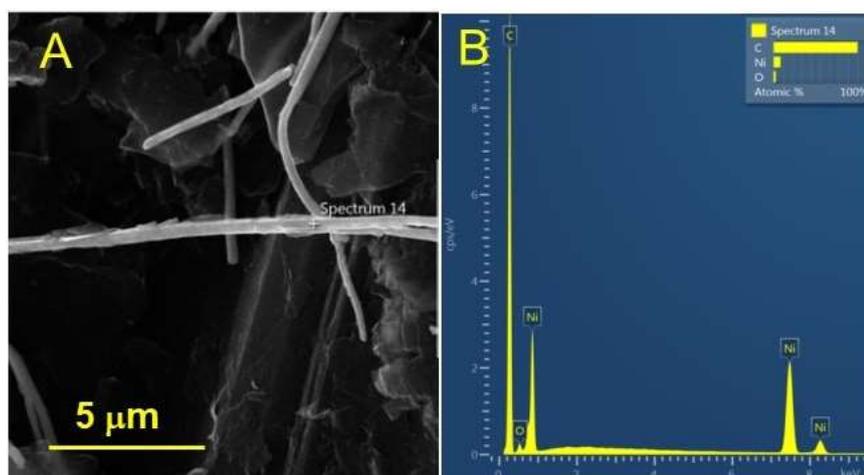


Figura 4-6. **A** Imagen SEM a mayor magnificación de CPE 18.0M-NiNWs. **B** Espectro EDS sobre un NiNWs.

4.3.3. Caracterización electroquímica de CPE NiNWs

Con el propósito de evaluar el comportamiento electroquímico de los NiNWs incluidos en el compósito, se efectuó el estudio de los diferentes electrodos de trabajo preparados (CPE, CPE 4.5M-NiNWs, CPE 9.0M-NiNWs y CPE 18.0M-

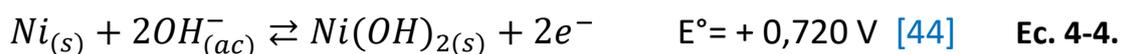
NiNWs) empleando voltamperometría cíclica (VC), amperometría y de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).

4.3.3-A. Comportamiento electroquímico de las especies de Ni en medio alcalino.

En la **Figura 4-7** se muestran voltamperogramas cíclicos obtenidos en NaOH 0,10 M, para CPE (—), CPE 4.5M-NiNWs (—), CPE 9.0M-NiNWs (—) y CPE 18M-NiNWs (—). El intervalo de potencial estudiado fue desde -0,200 a +0,800 V, a una velocidad de barrido (V_b) de 0,100 V s⁻¹. En todos los casos, los voltamperogramas de los electrodos compósito que contienen NiNWs presentan los procesos redox característico correspondientes a la oxido-reducción de las especies Ni(OH)₂/NiOOH [23–26,41–43], como consecuencia del comportamiento electroquímico de los NiNWs expuestos en la superficie del electrodo. Mientras que, en ausencia de NiNWs, en el voltamperograma que corresponde a CPE (—), no se observan tales procesos redox (figura insertada en la **Figura 4-7**).

Analizando los voltamperogramas cíclicos de los compósitos modificados con NiNWs, en el barrido en sentido anódico se puede observar una pequeña señal de corriente en forma de “hombro” a +0,520 V, asociada a la oxidación del escaso contenido de Ni(OH)₂, cuya formación ocurre, tal como se discutió previamente, de manera espontánea sobre la superficie de los nanohilos durante la etapa de disolución de la membrana. El proceso de oxidación del Ni(OH)₂ genera la especie oxidada NiOOH (**ecuación 4-1**).

Adicionalmente, es importante destacar que a potenciales mayores a +0,520 V ocurre la oxidación electroquímica de níquel metálico (Ni(0)) para dar origen a Ni(OH)₂. Según la siguiente reacción:



Por lo tanto, cuando se alcanzan potenciales mayores que +0,720 V aumentará el contenido de Ni(OH)₂ en la superficie del electrodo y consecuentemente la cantidad de NiOOH también se incrementará. Por lo tanto, debido a la sumatoria de estos procesos, cuando se realiza el barrido en sentido inverso, en la rama catódica puede observarse más claramente una corriente de pico a +0,320 V, que corresponde al proceso de reducción de NiOOH a Ni(OH)₂ (ecuación 4-1.) [23].

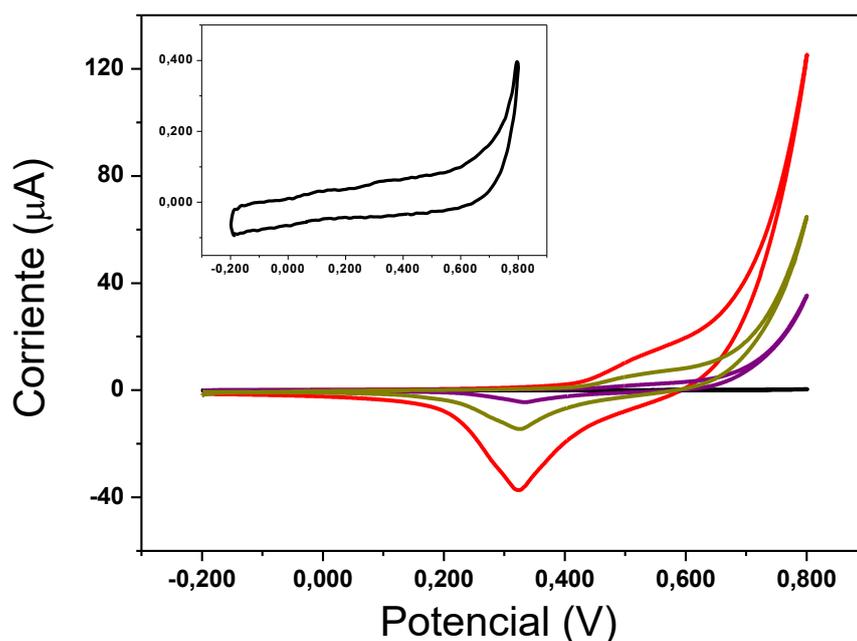


Figura 4-7. Voltamperogramas cíclicos sobre CPE (—), CPE 4.5M-NiNWs (—), CPE 9.0M-NiNWs (—), CPE 18.0M-NiNWs (—). **Figura insertada:** Voltamperogramas cíclico sobre CPE (—). Electrolito soporte: NaOH 0,10 M. Velocidad de barrido: 0,100 V s⁻¹.

Consecuentemente a medida que crece la proporción de NiNWs en el compósito, se incrementan las corrientes de oxidación y reducción de las especies de níquel. Esta observación demuestra que la respuesta electroquímica obtenida

está relacionada directamente con la cantidad de nanomaterial expuesto en la superficie del electrodo de trabajo. Es importante remarcar que, no se incrementó aún más el contenido de NiNWs para encontrar una relación costo/beneficio favorable, entre la cantidad de nanomaterial incluido en el compósito y la señal analítica observada. Por lo tanto, se seleccionó el compósito CPE 18M-NiNWs, el cual presenta el mejor desempeño entre los compósitos ensayados.

Es interesante remarcar que, si el electrodo es sometido a un pretratamiento de ciclos sucesivos en una solución de NaOH, ambos procesos redox demuestran un incremento en la corriente de pico. Esta estrategia fue evaluada en experimentos subsiguientes, con el objetivo de incrementar el contenido de ambas especies en la superficie del electrodo.

4.3.3-B. Efecto del potencial de corte en el pretratamiento

Se llevaron a cabo experimentos de VC en diferentes intervalos de potencial, para evaluar el efecto del potencial de corte anódico en los procesos redox de las especies de níquel. Para ello, los ensayos se efectuaron fijando el límite de potencial catódico en $-0,200$ V y variando el límite anódico hasta diferentes valores de potencial $+0,400$ (—), $+0,500$ (—), $+0,600$ (—), $+0,700$ (—) y $+0,800$ V (—) (**Figura 4-8**). En todos los experimentos se registraron 10 ciclos consecutivos empleando como electrolito soporte NaOH $0,10$ M. Para simplificar, en la **Figura 4-8.A** se muestra sólo el décimo ciclo de cada experimento.

Como se puede observar, cuando el valor límite de potencial es $+0,400$ V no se definen los picos correspondientes a los procesos redox de las especies de níquel. A medida que se amplía la ventana de potencial de trabajo hacia mayores valores de corte anódico, los procesos redox de las especies de níquel tienen lugar y comienzan a evidenciarse incipientemente los picos, los cuales se hacen aún más notables cuando el límite anódico se hace más positivo. Las corrientes de pico

alcanzan un valor máximo cuando se fija el límite de potencial anódico en +0,800 V. A potenciales mayores que +0,800 V la oxidación del electrolito soporte es muy importante, por lo cual, se definió este valor como potencial límite de corte anódico para futuros experimentos.

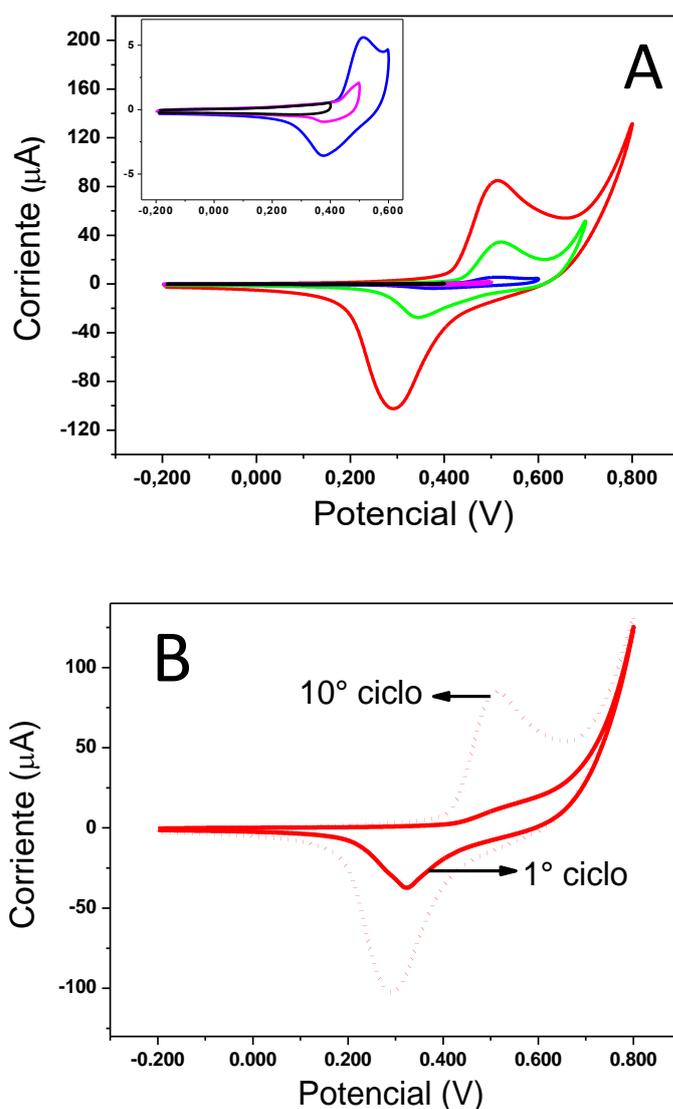


Figura 4-8. A. Voltamperogramas cíclicos luego de realizar 10 barridos sucesivos para CPE 18.0M-NiNWs, usando diferentes potenciales de corte anódico: +0,400 (—), +0,500 (—), +0,600 (—), +0,700 (—) y +0,800 V (—). **B.** Comparación de primer (trazo continuo) y décimo ciclo (trazo cortado) sobre CPE 18.0M-NiNWs. **Figura insertada:** detalle de los voltamperogramas cíclicos con potencial de corte: 0,400 (—), +0,500 (—), +0,600 (—). Electrolito soporte: NaOH 0,10 M. Velocidad de barrido: 0,100 V s⁻¹.

En la **Figura 4-8.B** se muestra de manera comparativa los voltamperogramas cíclicos sobre CPE 18.0M-NiNWs del primer y décimo ciclo. Es importante remarcar el significativo crecimiento de las corrientes y la mejor definición de los picos correspondientes a la cupla redox $\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$ conforme se incrementa el número de ciclos a los que se somete el electrodo.

4.3.3-C. Efecto del número de ciclos en el pretratamiento

Tal como fue discutido previamente (**ecuación 4-2**), el NiOOH actúa como electrocatalizador en presencia de compuestos orgánicos. En este proceso se regenera el $\text{Ni}(\text{OH})_2$ en la superficie del electrodo y de esta manera el sistema se retroalimenta, dando origen a un ciclo catalítico [27,28,38,45,46].

Por lo tanto, con el objetivo de incrementar la cantidad de nanomaterial catalítico en la superficie del electrodo, y consecuentemente mejorar su eficiencia en el proceso de electrooxidación, se evaluó la posibilidad llevar a cabo un pretratamiento electroquímico. Para ello, se sometió el electrodo de trabajo a ciclos sucesivos empleando NaOH 0,10 M. En la **Figura 4-9.A** se observa la respuesta voltamperométrica de CPE 18.0M-NiNWs donde es posible apreciar el incremento del valor de las corrientes de pico anódico y catódico, correspondientes a los procesos redox de las especies de níquel. Estos valores de corriente fueron analizados en función del número de ciclos. En la **Figura 4-9.B** se muestra la variación del valor absoluto de la corriente catódica (I_{pc}) correspondiente al proceso de reducción de NiOOH conforme se incrementa el número de ciclos consecutivos desde 1 hasta 15. Como puede observarse la corriente incrementa significativamente en los primeros ciclos. Para una mejor comprensión de esta observación, en la **Figura 4-9.C** se muestra el porcentaje de incremento de la corriente de pico respecto al ciclo anterior, evidenciando un aumento de la I_{pc} desde el primer ciclo al segundo del 72 % mientras que a partir del décimo ciclo el

incremento es menor al 5 % y la corriente se mantiene prácticamente constante, sin cambios apreciables. Por lo tanto, se seleccionó como pretratamiento 10 ciclos entre los valores límites de potencial -0,200 V a +0,800 V a 0,100 V/s.

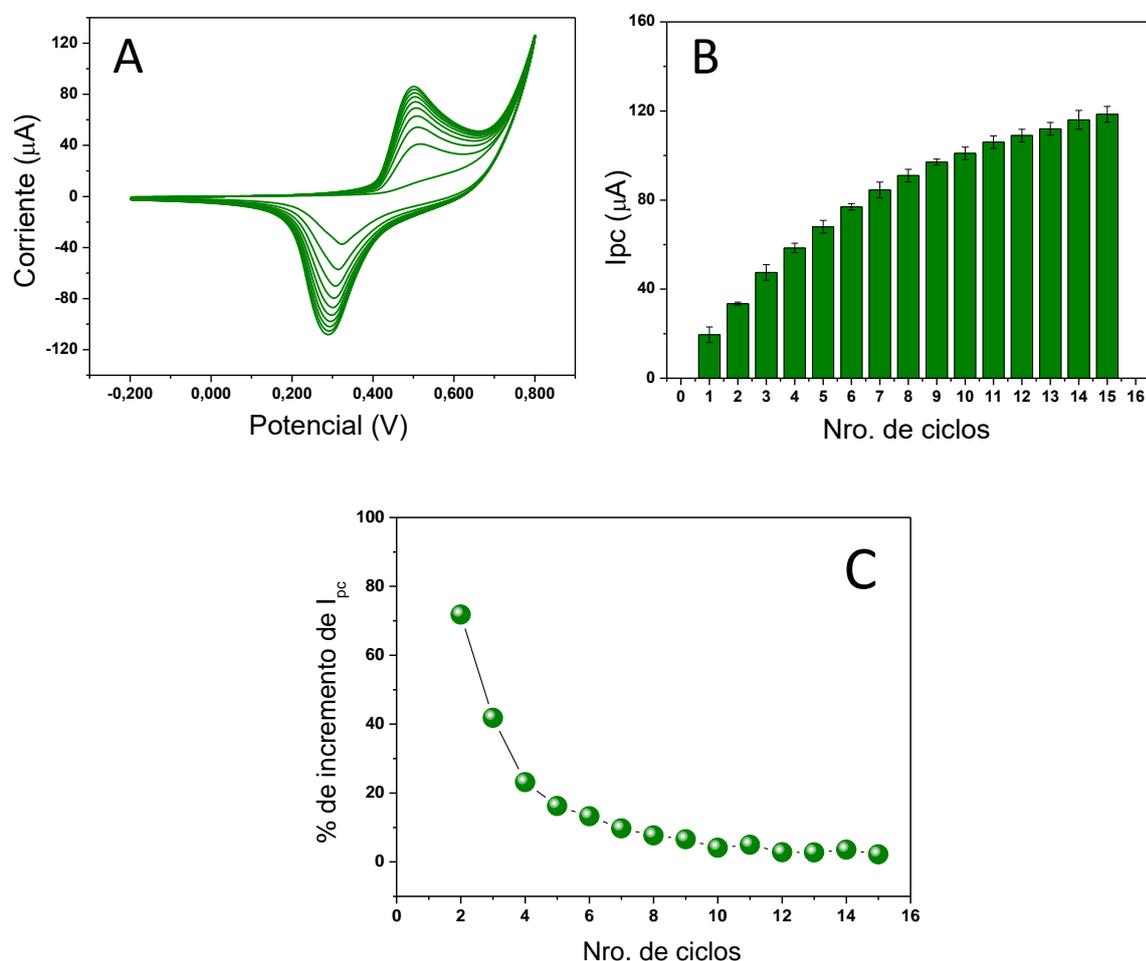


Figura 4-9.A. Voltamperogramas cíclicos consecutivos para CPE 18.0M-NiNWs. Electrolito soporte: NaOH 0,100 M. Velocidad de barrido: 0,100 V s⁻¹. **B.** Gráfico de valor absoluto de la corriente de pico catódico en función del número de ciclos. **C.** Porcentaje de incremento de la corriente de pico respecto al ciclo anterior. Calculado a partir de los valores de I_{pc} mostrado en **Figura 4-9. A.**

4.3.4. Selección del potencial de trabajo

Se realizaron experimentos de voltamperometría hidrodinámica (VH) con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de trabajo y seleccionar con exactitud el potencial para la electro-oxidación de EtOH mediante experimentos

amperométricos. En la **Figura 4-10** se muestran los VH obtenidos para agregados de etanol $3,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE (●) y CPE 18.0M-NiNWs (●), tratados previamente por VC con 10 ciclos, entre -0,200 V a +0,800 V a 0,100 V/s en NaOH 0,10 M. Como se mencionó anteriormente, la presencia del material electrocatalítico es imprescindible para que ocurra el proceso de oxidación del etanol, ya que para CPE la respuesta hacia EtOH es nula en toda la ventana de potencial estudiada. Para CPE 18.0M-NiNWs (●) no se observa respuesta hacia EtOH entre +0,100 V y +0,400 V, es decir la superficie no es reactiva en este intervalo de potencial. La electro-oxidación de etanol comienza a +0,450 V sobre alcanzando el máximo de corriente a +0,550 V. Por lo tanto, se seleccionó este potencial para posteriores experimentos amperométricos.

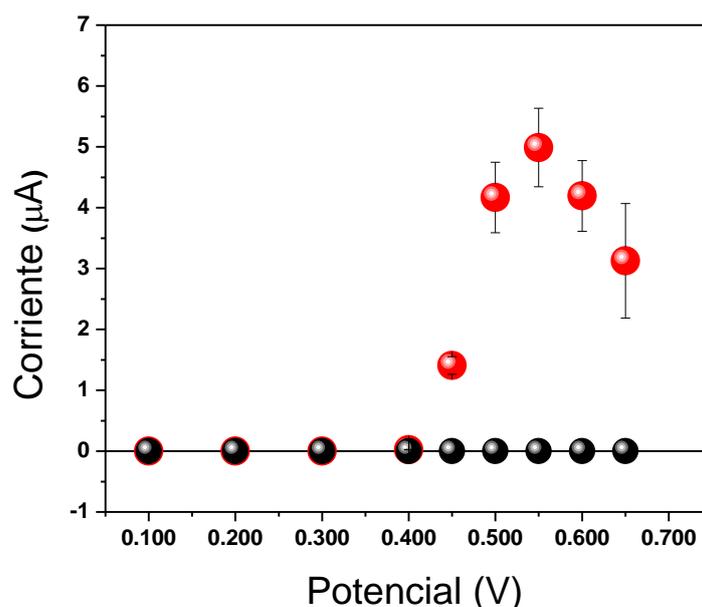


Figura 4-10. Voltamperogramas hidrodinámicos para etanol $3,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE (●) y CPE 18.0M-NiNWs (●). Electrolito soporte: NaOH 0,100 M.

4.3.5. Efecto del contenido de NiNWs en el compuesto

Un aspecto crítico a tener en cuenta es el contenido de NiNWs en el compuesto. Para ello se analizó el comportamiento electroquímico de las distintas

plataformas, tratadas previamente por VC con 10 ciclos, entre -0,200 V a +0,800 V a 0,100 V/s en NaOH 0,10 M (descriptas en la sección 4.2.2.) por EIE en una solución de EtOH 0,050 M, en un intervalo de frecuencias entre $1,0 \times 10^{-1}$ a $1,0 \times 10^5$ Hz, a un valor de potencial de trabajo de 0,550 V y aplicando una perturbación de 0,010 V. En la **Figura 4-11** se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos sobre CPE 4.5M-NiNWs (●), CPE 9.0M-NiNWs (▲), CPE 18.0M-NiNWs (●) y su comparación con la plataforma que no contiene los nanohilos CPE (▲). Los datos experimentales se representan en símbolos mientras que, en trazo continuo se muestra el ajuste obtenido a partir de los datos experimentales con el correspondiente circuito equivalente simple $R_s(R_{tc}C_{dc})$.

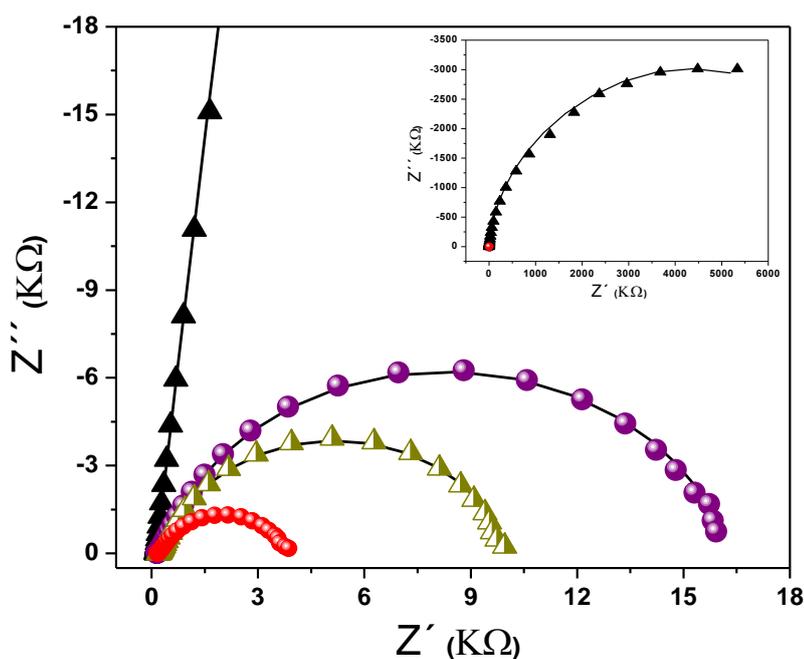


Figura 4-11. Diagramas de Nyquist para los espectros de impedancia sobre CPE (▲), CPE 4.5M-NiNWs (●), CPE 9.0M-NiNWs (▲), CPE 18.0M-NiNWs (●) en una solución de etanol 0,050 M. Rango de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,550 V. Electrolito soporte NaOH 0,10 M. En la **figura insertada** se muestra el espectro completo de CPE (—).

Como puede observarse, el material compuesto no modificado con NiNWs, CPE, presenta una elevada R_{tc} y la presencia de una mínima cantidad de NWs (CPE 4.5M-NiNWs) produce una drástica disminución de R_{tc} (respecto CPE), evidenciando una vez más el rol indispensable de los NiNWs en la actividad electrocatalítica hacia EtOH, como se demostró previamente. Asimismo, el aumento de nanomaterial en el compuesto hace más eficiente la catálisis, contribuyendo a la disminución de R_{tc} a medida que se incrementa la cantidad de NiNWs. Estos resultados son consistentes con el aumento de la sensibilidad obtenido por amperometría a medida que aumenta el contenido de NiNWs. En la **Tabla 4-2** se muestran los correspondientes valores de R_{tc} obtenidos para cada superficie estudiada, y en la **Figura 4-12** se representan gráficamente estos valores R_{tc} junto con el circuito equivalente utilizado (figura insertada).

Tabla 4-2. Valores de resistencia a la transferencia de carga para los distintos electrodos compósitos.

	R_{tc} (KΩ)
CPE	$(7 \pm 2) \times 10^3$
CPE 4.5M-NiNWs	$(15,8 \pm 0,3)$
CPE 9.0M-NiNWs	(11 ± 2)
CPE 18.0M-NiNWs	$(3,6 \pm 0,2)$

Para experimentos posteriores, se seleccionó la plataforma que presentó el mejor compromiso en la relación señal/ruido, sensibilidad, R_{tc} , estabilidad de la señal y tiempo de respuesta. Por lo tanto, el compuesto seleccionado fue CPE 18.0M-NiNWs.

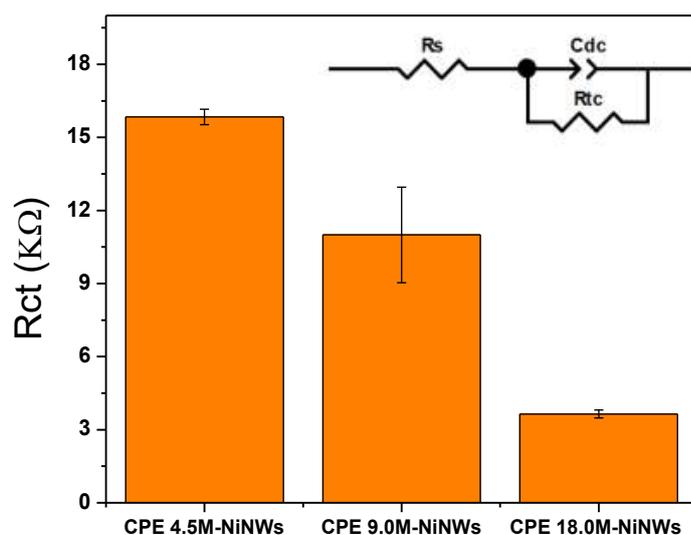
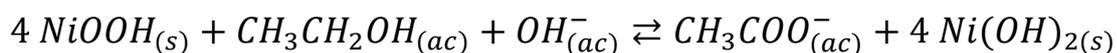


Figura 4-12. Variación de la resistencia a la transferencia de carga en función de los compósitos estudiados. Figura insertada: circuito equivalente empleado para ajustar los datos de la **Figura 4-11**.

4.3.6. Evaluación de la respuesta electroquímica del nanocompuesto en presencia de etanol

Como se mencionó anteriormente el NiOOH debe estar presente en la superficie del electrodo ya que es la especie responsable de la electro-oxidación catalítica de diversos compuestos orgánicos en medio alcalino, entre ellos el etanol (EtOH), a través de la reacción:



Para caracterizar y evaluar el comportamiento electroquímico de la plataforma obtenida (CPE 18.0M-NiNWs) hacia la oxidación de EtOH se realizaron experimentos amperométricos, voltamperométricos y de espectroscopia de impedancia electroquímica.

En la **Figura 4-13.A** se comparan los registros amperométricos obtenidos con CPE (—), CPE 18.0M-NiNWs sin pretratamiento (—) y CPE 18.0M-NiNWs tratado previamente (—), como se describe en el **apartado 4.3.3-C**. Los ensayos amperométricos se realizaron efectuando adiciones sucesivas de EtOH $1,0 \times 10^{-3}$ M empleando NaOH 0,10 M como electrolito soporte. En la **figura 4-13.B** se pueden observar las curvas de calibración obtenidas a partir de los correspondientes registros amperométricos mostrados en **A**. Como era de esperar, sobre CPE (●) no se observó respuesta hacia etanol. Cabe destacar que sobre CPE 18.0M-NiNWs sin pretratamiento (●) se obtiene una sensibilidad de $(668 \pm 9) \mu\text{AM}^{-1}$ ($R^2= 0,996$), mientras que cuando se realizó el pretratamiento CPE NiNWs (●) la sensibilidad se incrementó prácticamente al doble, obteniendo un valor de $(1372 \pm 4) \mu\text{AM}^{-1}$ ($R^2= 0,999$).

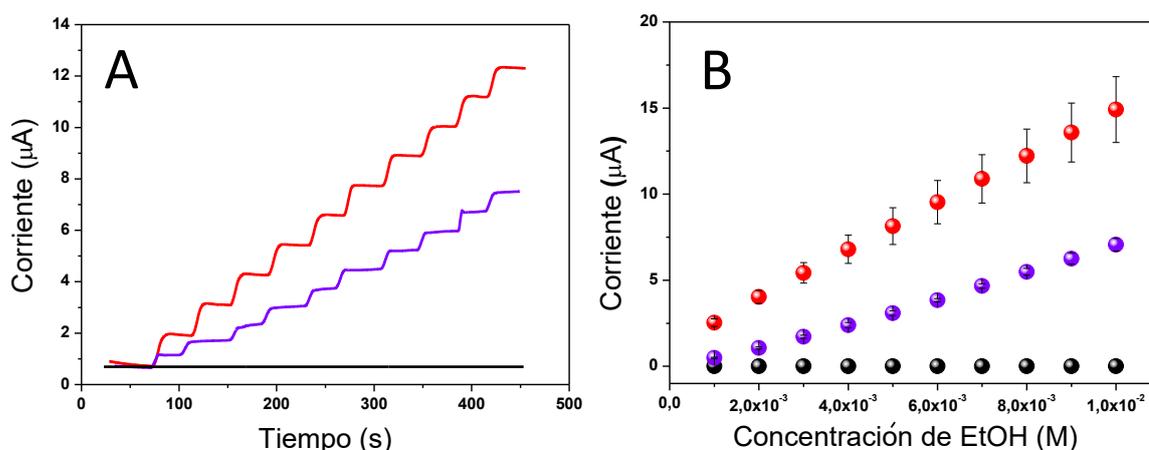


Figura 4-13. A. Registros amperométricos para la electro-oxidación de etanol sobre diferentes superficies: CPE (—), CPE NiNWs sin pre-tratamiento (—) y CPE NiNWs tratado previamente (—). Adiciones de etanol $1,0 \times 10^{-3}$ M. Electrolito soporte: NaOH 0,100 M. Potencial de trabajo: 0,550 V. **B.** Curvas de calibración para etanol, correspondientes a los registros amperométricos mostrados en **A**.

Por lo tanto, queda claramente evidenciado que los NiNWs deben estar presentes en el compósito para que ocurra la oxidación de EtOH y que el pre-tratamiento en medio alcalino mejora significativamente el proceso de oxidación

contribuyendo a la amplificación de la sensibilidad, merced al aumento de material electrocatalítico disponible en la superficie del electrodo.

Por otra parte, se evaluó la respuesta catalítica de CPE 18.0M-NiNWs hacia etanol a través de experimentos impedimétricos en soluciones de etanol de distinta concentración en NaOH 0,10 M, a un potencial de +0,550 V, en el intervalo de frecuencias de $1,0 \times 10^{-1}$ a $1,0 \times 10^5$ Hz y aplicando una perturbación de 0,010 V. Es importante señalar que el electrodo de trabajo CPE 18.0M-NiNWs fue pretratado electroquímicamente antes de cada experimento impedimétrico. Las concentraciones estudiadas fueron: 0,100 M (●), 0,075 M (●), 0,050 M (●) y 0,025 M (●). Los diagramas de Nyquist correspondientes se muestran en la **Figura 4-14**, donde puede observarse que la R_{tc} disminuye conforme se incrementa la concentración de etanol. Esta observación es consistente con el comportamiento electrocatalítico del nanomaterial hacia etanol [47]. Los datos experimentales se muestran en símbolos mientras que en trazo continuo se muestra el ajuste de éstos con el correspondiente circuito eléctrico equivalente. Los datos experimentales fueron satisfactoriamente ajustados con un circuito equivalente simple $R_s(R_{tc}C_{dc})$, el cual se muestra en la figura insertada de la **Figura 4-14**, donde R_{tc} es la resistencia a la transferencia de carga, que está en paralelo con la capacitancia de la doble capa (C_{dc}), los cuales a su vez se encuentran en serie con la resistencia de la solución (R_s). En la figura insertada además se muestra la dependencia de la R_{tc} con la concentración de etanol, demostrando un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

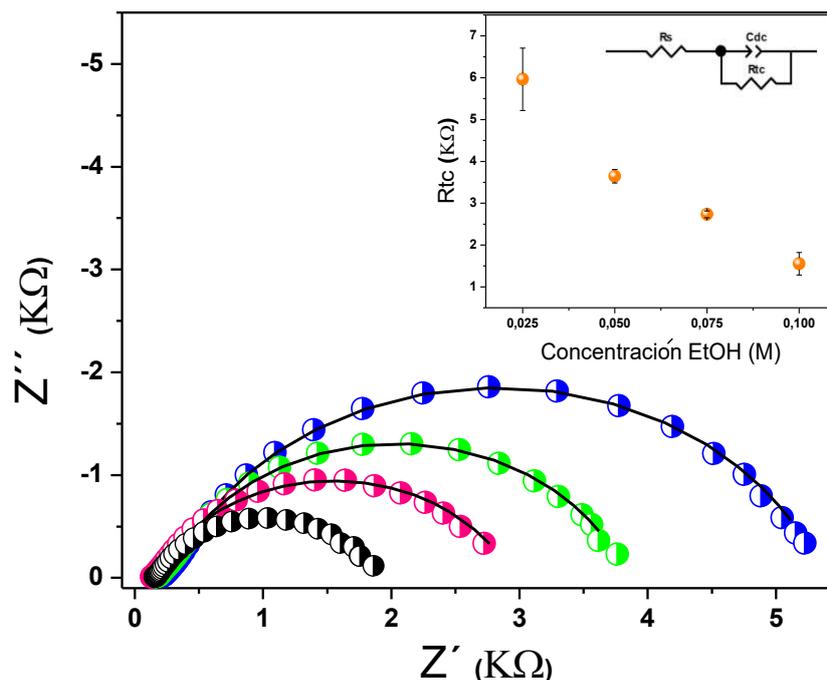


Figura 4-14. Diagramas de Nyquist para los espectros de impedancia sobre CPE 18.0M-NiNWs en soluciones de etanol de distinta concentración: 0,100 M (—), 0,075 M (—), 0,050 M (—) y 0,025 M (—). Rango de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,550 V. Electrolito soporte NaOH 0,10 M. En la **figura insertada** se muestra los valores de resistencia a la trasferencia de carga en función de la concentración de etanol y el circuito equivalente utilizado para el ajuste de los datos.

4.3.7. Desempeño analítico de CPE 18.0M-NiNWs

Una vez optimizadas las variables experimentales, se llevó a cabo la evaluación del desempeño analítico del sensor nanoestructurado CPE 18.0M-NiNWs hacia la oxidación no enzimática de etanol.

La **Figura 4-15** presenta el registro amperométrico a 0,550 V para 10 adiciones sucesivas de etanol $1,0 \times 10^{-4}$ M, seguido de 10 adiciones sucesivas de etanol $1,0 \times 10^{-3}$ M.

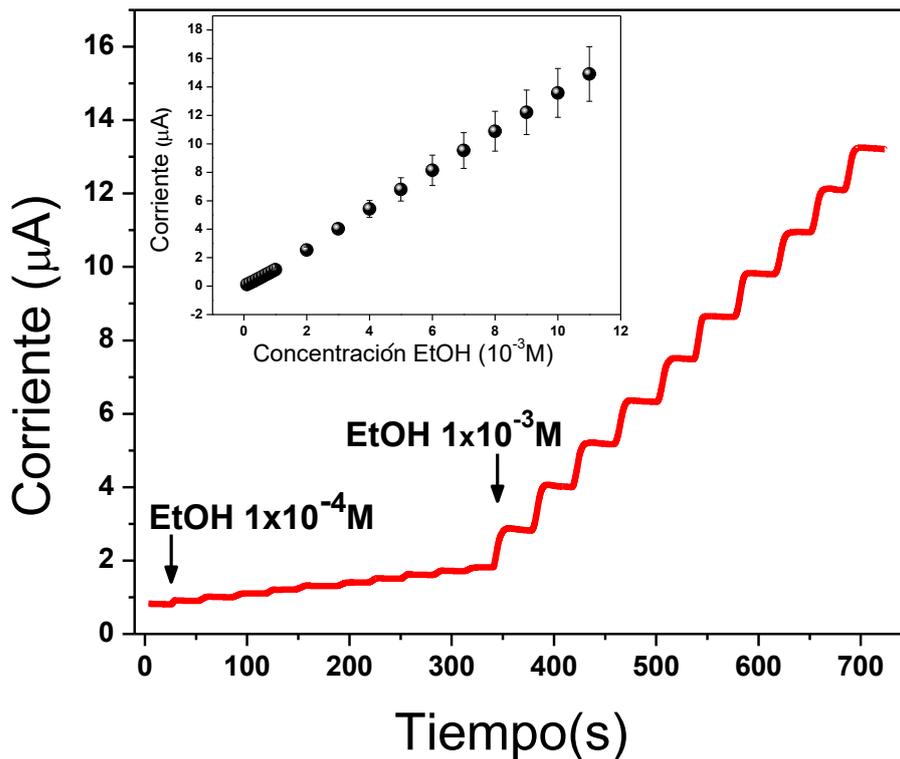


Figura 4-15. Registros amperométricos para 10 adiciones de etanol $1,0 \times 10^{-4}$ M seguidas de 10 adiciones de etanol $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE 18.0M-NiNWs. Electrolito soporte: NaOH 0,10 M. Potencial de trabajo: 0,550 V. **Figura insertada:** Curva de calibración correspondiente.

Es posible observar una respuesta rápida y bien definida hacia etanol, donde el 90 % de la corriente en estado estacionario se alcanza en 11 segundos. A partir de la curva de calibración correspondiente, que se muestra en la figura insertada en la **figura 4-15**, se obtuvieron los parámetros analíticos de la plataforma de detección, los que se resumen en la **Tabla 4-3**.

Tabla 4-3. Parámetros analíticos para CPE 18.0M-NiNWs.

S (μAM^{-1})	(1372 \pm 4)
LD (M)	3,1 $\times 10^{-7}$
LQ (M)	9,4 $\times 10^{-7}$
R²	0,9999
IL (M)	0,10 $\times 10^{-3}$ - 11 $\times 10^{-3}$

*El LD fue calculado como $3,3\sigma/S$, el LQ fue calculado como $10\sigma/S$, donde σ es la desviación estándar de la señal blanco.

Analizando los parámetros mencionados cabe destacar que el sensor nanoestructurado demostró tener un excelente rendimiento en términos de sensibilidad y un importante intervalo lineal. La plataforma presenta un LD y LQ comparable y en algunas ocasiones menor que muchos de los sensores y biosensores reportados en bibliografía [18,48–52]. A modo comparativo los parámetros analíticos se muestran en la **tabla 4-4**.

El sensor CPE 18.0M-NiNWs fue empleado para la determinación no enzimática de etanol en las bebidas alcohólicas comerciales Vodka (Absolut[®]) y Cachaça (51[®]). Los valores obtenidos con el sensor fueron (40 \pm 1) % V/V y (39 \pm 1) % V/V, respectivamente, los que se correlacionan con los valores informados por el fabricante (40 % para Vodka y 39 % Cachaça). Por lo tanto, esta metodología propuesta para la cuantificación de EtOH no sólo se realiza de manera altamente sensible sino que también permite cuantificar EtOH en muestras reales con un alto grado de exactitud y precisión.

Tabla 4-4. Comparación del desempeño analítico de diferentes (bio)sensores para la determinación de etanol.

(Bio)sensor	Sensibilidad	LD-LQ	Intervalo lineal	R ²	Comentarios	Ref.
CPE/NiO-NDS	3,51 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ [(3,51 x 10 ³ $\mu\text{A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$)]*	1 mM-N/A [1 x 10 ³ $\mu\text{M-N/A}$]*	1-47 mM [(1-47) x 10 ⁻³ M]*	0,99735	Muestra real: N/D Estabilidad operacional: N/D Estabilidad a largo término: N/D	[27]
NiNWarray	0,27 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ [(0,27 x 10 ⁶) $\mu\text{A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$]*	1,03 $\mu\text{M-N/D}$	N/D	0,9997	Muestra real: N/D Estabilidad operacional: N/D Estabilidad a largo término: N/D	[38]
SPCE/RA/ADH + NAD ⁺	1,36 $\mu\text{A mM}^{-1}$ [(1,36 x 10 ³ $\mu\text{A M}^{-1}$)]*	7,10 $\mu\text{M-23,7 } \mu\text{M}$	23,71-1000 μM [(0,02371-1)x 10 ⁻³ M]*	0,9994	Muestra real: cerveza, vino blanco Estabilidad operacional: el 2do día la respuesta cae a 85,3% y al día 10 cae a 21,6% del valor inicial. Estabilidad a largo término: a 8 semanas la respuesta cae a 21,2% del valor inicial.	[45]
GCE-MWCNT-Nf-HRP-SG/Chit-FcAOx-PEI	150 \pm 0,25 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ [(150 \pm 0,25)x 10 ³ $\mu\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$] ² *	2,320 \pm 0,018 $\mu\text{M-N/D}$	5-3000 μM [(0,005-3) x 10 ⁻³ M]*	0,9976	Muestra real: cerveza. Estabilidad operacional: mantiene el 90% de su actividad inicial después de 28 mediciones sucesivas. Estabilidad a largo término: mantiene el 90% de la respuesta inicial luego de 5 semanas (4 ^o C).	[46]
Cu ₅₂ /Ni ₄₈ /N-grafeno/GCE	31,26 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ [(31,26 x 10 ³ $\mu\text{A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$)]*	0,10 mM-N/A [100 $\mu\text{M-N/A}$]*	0,2-37,1 mM [(0,2-37,1) x 10 ⁻³ M]*	0,9981	Muestra real: N/A Estabilidad operacional: reproducibilidad 10 amperometrías sucesivas (RSD=4,2%) Estabilidad a largo término: al 7 ^{mo} día la respuesta cae al 93,7% del valor inicial.	[48]
SPCE-PrNPs	0,2757 $\mu\text{A ppm}^{-1}$ (12,7 x 10 ³ $\mu\text{A M}^{-1}$)	N/D	700-4700 ppm [(15-102) x 10 ⁻³ M]*	0,999	Muestra real: cerveza y vino blanco. Estabilidad operacional: Electroodos descartables. Pérdida de sensibilidad menor al 13% luego de 3 mediciones consecutivas. Estabilidad a largo término: respuesta hasta el día 30 sin cambios apreciables.	[49]
CPE 18.0M-NiNWs	1372 \pm 4 $\mu\text{A M}^{-1}$	0,31 $\mu\text{M-0,94 } \mu\text{M}$	(0,1 - 11,0) x 10 ⁻³ M	0,9999	Muestra real: Vodka y Cachaça Estabilidad operacional: sin cambios apreciables por 5 amperometrías consecutivas. Estabilidad a largo término: al menos 60 días.	Este trabajo

* Valores calculados a partir de la información provista por las referencias.

N/D: información no disponible.

CPE/NiO-NDs: electrodo de pasta de carbono modificado con nanodiscos de NiO.

SPCE/RA/ADH + NAD⁺: electrodos serigrafiados modificados con ácido rosmarínico con alcohol deshidrogenasa inmovilizada (ADH) en presencia del cofactor NAD⁺.

Cu₅₂/Ni₄₈/N-grafeno/GCE: electrodos de carbono vítreo modificados con Cu₅₂/Ni₄₈/N-grafeno.

PtNPs-SPCEs: electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de platino (PtNPs).

NiNWarray: arreglo de nanohilos de níquel.

GCE-MWCNT-Nf-HRP-SG/Chit-FcAOx-PEI: ferroceno y alcohol oxidasa (FcAOx) inmovilizados en una película de quitosano sol-gel recubierto con peroxidasa picante de rábano (HRP) sobre electrodos de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT). Buffer fosfato con potasio (KPBS).

Con el objetivo de evaluar la selectividad del sensor frente a dos sustancias habitualmente presentes en bebidas y alimentos tal como la glucosa y el anión sulfito, se llevaron a cabo ensayos amperométricos de estas sustancias en presencia de etanol. La **Figura 4-16** muestra los perfiles amperométricos sobre CPE 18.0M-NiNWs para etanol y glucosa (A) o anión sulfito (B), los cuales pueden actuar como posibles interferentes debido a que se encuentran presentes en algunas bebidas alcohólicas [51].

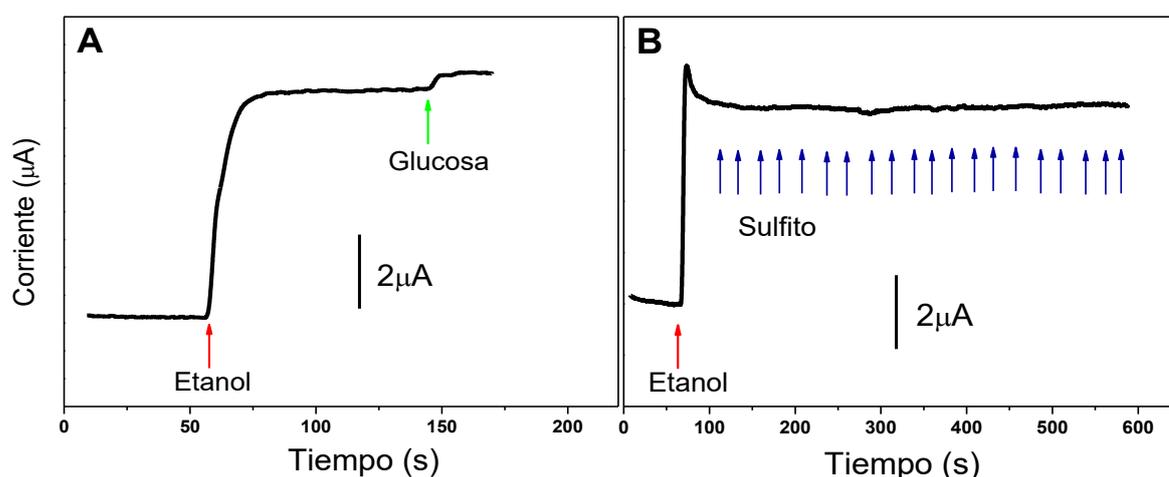


Figura 4-16.A. Registros amperométricos obtenidos sobre CPE 18.0M-NiNWs para una adición correspondiente a 39,0 % V/V de etanol seguida de una adición de glucosa 5,50 g/L. **B.** Registro amperométrico sobre CPE 18.0M-NiNWs para una adición correspondiente a 39,0 % v/v de etanol seguida de 20 adiciones de 20 ppm de sulfito. Electrolito soporte: NaOH 0,100 M. Potencial de trabajo: 0,550 V.

Se evaluó la interferencia de una adición correspondiente a 5,50 g/L de glucosa en comparación con la señal obtenida para una adición correspondiente a 39,0 % V/V de solución de etanol, como en las bebidas destiladas más comunes. En este caso la interferencia de la glucosa fue del 6,7 % de la respuesta del etanol.

Del mismo modo se evaluó la interferencia del anión sulfito, el cual es utilizado comúnmente como conservante y antioxidante en alimentos y bebidas [53–55]. En consecuencia se realizaron 20 adiciones de 20 ppm de una solución de sulfito. Vale la pena destacar que el anión sulfito no produce ninguna señal aun cuando se encuentra presente en una concentración 40 veces superior al nivel permitido en alimentos y bebidas (hasta 10 ppm) [53,54]. Dado que las bebidas alcohólicas destiladas no contienen carbohidratos, como consecuencia del proceso de destilación, se puede afirmar que este sistema de detección es aplicable al control de calidad del nivel de etanol en las bebidas destiladas.

4.3.8. Estabilidad de la plataforma

La estabilidad operacional del sensor en condiciones de uso continuo fue evaluada empleando la misma superficie del sensor en ensayos amperométricos consecutivos. Para tal fin, se realizaron cinco experimentos amperométricos sucesivos para 10 adiciones de etanol $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE 18.0M-NiNWs. La **Figura 4-17** muestra la sensibilidad obtenida para cada curva de calibración respecto al primer calibrado. La plataforma presentó valores cercanos al 100 % en 5 ensayos consecutivos, con un RSD 4,8 % demostrando una excelente estabilidad intraensayo a corto plazo empleando la misma superficie.

Es interesante destacar que, cada experimento para la realización de la calibración toma alrededor de 10 minutos, y después de 5 ensayos con la misma superficie, el tiempo de trabajo del electrodo alcanzó casi 1 hora manteniendo la sensibilidad cerca del valor inicial, con una excelente reproducibilidad.

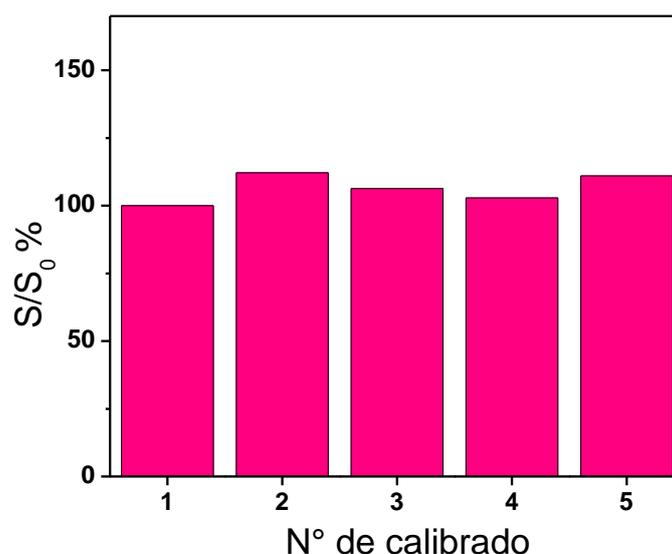


Figura 4-17. Sensibilidad normalizada para cinco calibraciones sucesivas de 10 adiciones de etanol $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE 18.0M-NiNWs. Electrolito soporte: NaOH 0,10 M. Potencial de trabajo: 0,550 V.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad de CPE 18.0M-NiNWs a largo plazo. El compuesto fue preparado y almacenado a temperatura ambiente, evaluándose la sensibilidad en ensayos amperométricos el primer día y los días 10, 20, 30 y 60. Se determinó en cada caso la sensibilidad del ensayo amperométrico en relación con la sensibilidad del primer día, la que fue considerada como el 100 % de la respuesta. Estos resultados se presentan en la **Figura 4-18**. CPE 18.0M-NiNWs demostró tener una reproducibilidad sobresaliente a lo largo del período estudiado, durante al menos 60 días. Este resultado demuestra la robustez del nanomaterial dentro del compuesto y su capacidad para mantener el comportamiento catalítico como el primer día, demostrando ventajas importantes en cuanto a estabilidad a diferencia del uso de enzimas u otras biomoléculas, en donde la respuesta puede caer drásticamente al cabo de horas o días.

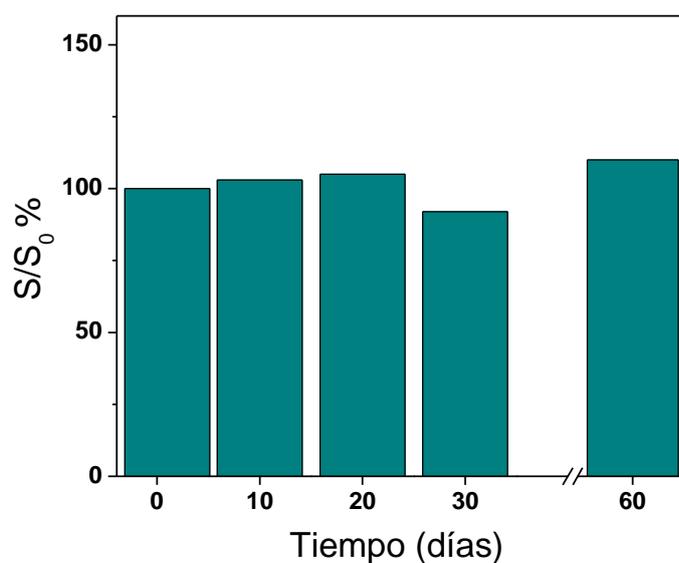


Figura 4-18. Sensibilidades normalizadas para etanol en función del tiempo (período de 60 días) comparada con la sensibilidad del primer día. Condiciones experimentales como en la **Figura 4-16**.

4.4. Conclusiones

Se sintetizaron NiNWs a través de un método simple y eficiente, logrando obtener NiNWs de estructura cristalina, de forma y tamaños altamente homogéneos. Los NiNWs fueron incluidos en una matriz compósito CPE 18.0M-NiNWs, demostrando tener una excelente actividad electrocatalítica para la oxidación de etanol en medio alcalino. El sensor nanocompuesto propuesto presenta propiedades sobresalientes que lo convierten en una excelente opción para la cuantificación eficiente de etanol en reemplazo de sensores enzimáticos.

En síntesis, CPE 18.0M-NiNWs demostró tener notables ventajas, entre las cuales cabe mencionar el procedimiento de síntesis simple del nanomaterial catalítico, el bajo costo, excelente desempeño analítico en términos de reproducibilidad sensibilidad y estabilidad operacional a corto y largo plazo. Estas características excepcionales convierten a CPE 18.0M-NiNWs en una alternativa

interesante para la determinación del contenido de etanol en muestras complejas, como bebidas alcohólicas.

4.5. Bibliografía

- [1] N.S. Ramgir, Y. Yang, M. Zacharias, Nanowire-based sensors, *Small*. 6 (2010) 1705–1722. doi:10.1002/sml.201000972.
- [2] M. García, P. Batalla, A. Escarpa, Metallic and polymeric nanowires for electrochemical sensing and biosensing, *Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 6–22. doi:10.1016/j.trac.2014.01.004.
- [3] Z.L. Wang, *Nanowires and Nanobelts: Materials, Properties and Devices. Volume 1: Metal and Semiconductor Nanowires, Volume 1*, Springer Science and Business Media, New York, 2003. doi:10.1007/978-0-387-28747-8.
- [4] A. Kumar, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, 26 (2005) 3995–4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
- [5] O.A. Loaiza, R. Laocharoensuk, J. Burdick, M.C. Rodriguez, J.M. Pingarron, M. Pedrero, J. Wang, Adaptive orientation of multifunctional nanowires for magnetic control of bioelectrocatalytic processes, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 1–5. doi:10.1002/anie.200604082.
- [6] B. Jurado-Sánchez, A. Escarpa, Milli, micro and nanomotors: Novel analytical tools for real-world applications, *Trends Anal. Chem.* (2016). doi:10.1016/j.trac.2016.03.009.
- [7] A. Zhang, C.M. Lieber, Nano-Bioelectronics, *Chem. Rev.* 116 (2016) 215–257. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00608.

-
- [8] E.S.A. Nouh, E.A. Baquero, L.M. Lacroix, F. Delpech, R. Poteau, G. Viau, Surface-Engineering of Ultrathin Gold Nanowires: Tailored Self-Assembly and Enhanced Stability, *Langmuir*. 33 (2017) 5456–5463. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00477.
- [9] M. García, J.R. Alonso-Fernández, A. Escarpa, Copper nanowires immobilized on the boards of microfluidic chips for the rapid and simultaneous diagnosis of galactosemia diseases in newborn urine samples, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9116–9125. doi:10.1021/ac402331v.
- [10] C. Zhu, H.-C. Peng, J. Zeng, J. Liu, Z. Gu, Y. Xia, Facile Synthesis of Gold Wavy Nanowires and Investigation of Their Growth Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 20234–20237. doi:10.1021/ja3091214.
- [11] J. Xu, X. Qiao, M. Arsalan, N. Cheng, W. Cao, T. Yue, Q. Sheng, J. Zheng, Preparation of one dimensional silver nanowire/nickel-cobalt layered double hydroxide and its electrocatalysis of glucose, *J. Electroanal. Chem.* 823 (2018) 315–321. doi:10.1016/j.jelechem.2018.06.028.
- [12] Q. Xu, G. Meng, F. Han, Porous AAO template-assisted rational synthesis of large-scale 1D hybrid and hierarchically branched nanoarchitectures, *Prog. Mater. Sci.* 95 (2018) 243–285. doi:10.1016/j.pmatsci.2018.02.004.
- [13] M. Arefpour, M. Almasi Kashi, F. Khansari Barzoki, M. Noormohammadi, A. Ramazani, Electrodeposited metal nanowires as transparent conductive electrodes: Their release conditions, electrical conductivity, optical transparency and chemical stability, *Mater. Des.* 157 (2018) 326–336. doi:10.1016/j.matdes.2018.07.048.
- [14] F. Guo, K. Ye, K. Cheng, G. Wang, D. Cao, Preparation of nickel nanowire arrays electrode for urea electro-oxidation in alkaline medium, *J. Power Sources*. 278 (2015) 562–568. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.12.125.
- [15] Z. Li, C. Leung, F. Gao, Z. Gu, Effects of Nanowire Length and Surface

- Roughness on the Electrochemical Sensor Properties of Nafion-Free, Vertically Aligned Pt Nanowire Array Electrodes, *Sensors*. 15 (2015) 22473–22489. doi:10.3390/s150922473.
- [16] Z. Zhang, L. Xin, K. Sun, W. Li, Pd-Ni electrocatalysts for efficient ethanol oxidation reaction in alkaline electrolyte, *Int. J. Hydrogen Energy*. 36 (2011) 12686–12697. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.06.141.
- [17] R.C. Sekol, M. Carmo, G. Kumar, F. Gittleson, G. Doubek, K. Sun, J. Schroers, A.D. Taylor, Pd-Ni-Cu-P metallic glass nanowires for methanol and ethanol oxidation in alkaline media, *Int. J. Hydrogen Energy*. 38 (2013) 11248–11255. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.017.
- [18] S. Blanco, R. Vargas, J. Mostany, C. Borrás, B.R. Scharifker, A novel nickel nanowire amperometric sensor: Direct current vs. alternating current strategies for ethanol, acetaldehyde and acetylcholine detection, *J. Electroanal. Chem.* 740 (2015) 61–67. doi:10.1016/j.jelechem.2014.12.028.
- [19] S. Ci, T. Huang, Z. Wen, S. Cui, S. Mao, D. a. Steeber, J. Chen, Nickel oxide hollow microsphere for non-enzyme glucose detection, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 251–257. doi:10.1016/j.bios.2013.11.006.
- [20] M.D. Obradović, Z.M. Stančić, U.Č. Lačnjevac, V.V. Radmilović, A. Gavrilović-Wohlmuther, V.R. Radmilović, S.L. Gojković, Electrochemical oxidation of ethanol on palladium-nickel nanocatalyst in alkaline media, *Appl. Catal. B Environ.* 189 (2016) 110–118. doi:10.1016/j.apcatb.2016.02.039.
- [21] B. Tao, J. Zhang, S. Hui, X. Chen, L. Wan, An electrochemical methanol sensor based on a Pd-Ni/SiNWs catalytic electrode, *Electrochim. Acta*. 55 (2010) 5019–5023. doi:10.1016/j.electacta.2010.04.013.
- [22] Z. Savari, S. Soltanian, A. Noorbakhsh, A. Salimi, M. Najafi, P. Servati, High sensitivity amperometric and voltammetric determination of persulfate with neutral red/nickel oxide nanowires modified carbon paste electrodes,

Sensors Actuators, B Chem. 176 (2013) 335–343.
doi:10.1016/j.snb.2012.09.079.

- [23] D.E. Simpson, K.E. Juda, D. Roy, Electroanalytical Assessment of the Function of Nickel in Alkaline Electrocatalysis of Glycerol, *Electrocatalysis*. 9 (2018) 86–101. doi:10.1007/s12678-017-0421-7.
- [24] M. Fleischmann, K. Korinek, D. Pletcher, the formation of adsorbed hydrogen radicals. At electrodes with higher hydrogen overpotentials, the same products often occur but the reactions are then thought to take place, *J. Electroanalytical Chem.* 31 (1971) 39–49. doi:10.1016/S0022-0728(71)80040-2.
- [25] H. Wang, Y. Cao, J. Li, J. Yu, H. Gao, Y. Zhao, Y.U. Kwon, G. Li, Preparation of Ni/NiO-C catalyst with NiO crystal: catalytic performance and mechanism for ethanol oxidation in alkaline solution, *Ionics*. 24 (2018) 2745–2752. doi:10.1007/s11581-017-2414-1.
- [26] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, Nickel amperometric detector prepared by electroless deposition for microchip electrophoretic measurement of alcohols and sugars, *Electroanalysis*. 16 (2004) 1603–1608. doi:10.1002/elan.200302996.
- [27] Q. Zhang, C. Zhang, J. Liang, P. Yin, Y. Tian, Orthorhombic α -NiOOH Nanosheet Arrays: Phase Conversion and Efficient Bifunctional Electrocatalysts for Full Water Splitting, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 3808–3818. doi:10.1021/acssuschemeng.6b02788.
- [28] M.S.E. Houache, E. Cossar, S. Ntais, E.A. Baranova, Electrochemical modification of nickel surfaces for efficient glycerol electrooxidation, *J. Power Sources*. 375 (2018) 310–319. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.08.089.
- [29] J. Deng, M.R. Nellist, M.B. Stevens, C. Dette, Y. Wang, S.W. Boettcher, Morphology Dynamics of Single-Layered Ni(OH)₂/NiOOH Nanosheets and

- Subsequent Fe Incorporation Studied by in Situ Electrochemical Atomic Force Microscopy, *Nano Lett.* 17 (2017) 6922–6926. doi:10.1021/acs.nanolett.7b03313.
- [30] L. Xu, Z. Wang, X. Chen, Z. Qu, F. Li, W. Yang, Ultrathin layered double hydroxide nanosheets with Ni(III) active species obtained by exfoliation for highly efficient ethanol electrooxidation, *Electrochim. Acta.* 260 (2018) 898–904. doi:10.1016/j.electacta.2017.12.065.
- [31] C. Schönenberger, Template synthesis of nanowires in porous polycarbonate membranes: electrochemistry and morphology, *J. Phys. Chem. B.* 5647 (1997) 5497–5505. doi:10.1021/jp963938g.
- [32] W. Yan, D. Wang, G.G. Botte, Template-assisted synthesis of Ni–Co bimetallic nanowires for urea electrocatalytic oxidation, *J. Appl. Electrochem.* (2015). doi:10.1007/s10800-015-0846-8.
- [33] S. Blanco, R. Vargas, J. Mostany, C. Borrás, B.R. Scharifker, Modeling the Growth of Nanowire Arrays in Porous Membrane Templates, *J. Electrochem. Soc.* 161 (2014) E3341–E3347. doi:10.1149/2.039408jes.
- [34] D.A. Bograchev, V.M. Volgin, A.D. Davydov, Simple model of mass transfer in template synthesis of metal ordered nanowire arrays, *Electrochim. Acta.* 96 (2013) 1–7. doi:10.1016/j.electacta.2013.02.079.
- [35] G. Cao, D. Liu, Template-based synthesis of nanorod, nanowire, and nanotube arrays, *Adv. Colloid Interface Sci.* 136 (2008) 45–64. doi:10.1016/j.cis.2007.07.003.
- [36] M.M.P.S. Neves, M.B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Streptavidin functionalized nickel nanowires: A new ferromagnetic platform for biotinylated-based assays, *Talanta.* 144 (2015) 283–288. doi:10.1016/j.talanta.2015.05.085.

-
- [37] B. Wang, S. Li, J. Liu, M. Yu, Preparation of nickel nanoparticle/graphene composites for non-enzymatic electrochemical glucose biosensor applications, *Mater. Res. Bull.* 49 (2014) 521–524. doi:10.1016/j.materresbull.2013.08.066.
- [38] M. Fleischmann, K. Korinek, D. Pletcher, The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution, *J. Electroanalytical Chem.* 31 (1971) 39–49. doi:10.1016/S0022-0728(71)80040-2.
- [39] S. Guzm, F. Te, E. Sucursal, L. Plata, The kinetics and mechanism of the nickel electrode-III. The potentiodynamic response of nickel electrodes in alkaline solutions in the potential region of Ni(OH)₂ formation, *Corros. Sci.* 18 (1978) 764–778.
- [40] J.L. Weininger, M.W. Breiter, Effect of Crystal Structure on the Anodic Oxidation of Nickel, *J. Electrochem. Soc.* 110 (1963) 484. doi:10.1149/1.2425798.
- [41] S. Majdi, A. Jabbari, H. Heli, A. A. Moosavi-Movahedi, Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel-curcumin complex modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta.* 52 (2007) 4622–4629. doi:10.1016/j.electacta.2007.01.022.
- [42] R.M.A. Hameed, Microwave irradiated Ni-MnO_x/C as an electrocatalyst for methanol oxidation in KOH solution for fuel cell application, *Appl. Surf. Sci.* 357 (2015) 417–428. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.201.
- [43] L. Qian, L. Gu, L. Yang, H. Yuan, D. Xiao, Direct growth of NiCo₂O₄ nanostructures on conductive substrates with enhanced electrocatalytic activity and stability for methanol oxidation., *Nanoscale.* 5 (2013) 7388–96. doi:10.1039/c3nr01104f.
- [44] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.

- [45] J. Deng, M.R. Nellist, M.B. Stevens, C. Dette, Y. Wang, S.W. Boettcher, S.W. Boettcher, Morphology Dynamics of Single-Layered Ni(OH)₂/NiOOH Nanosheets and Subsequent Fe Incorporation Studied by in-situ Electrochemical Atomic Force Microscopy, *Nano Lett.*, 2017, 17 (11), 6922–6926. doi:10.1021/acs.nanolett.7b03313.
- [46] K.E. Toghill, L. Xiao, M.A. Phillips, R.G. Compton, The non-enzymatic determination of glucose using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron-doped diamond electrode or nickel foil electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 147 (2010) 642–652. doi:10.1016/j.snb.2010.03.091.
- [47] R.H. Tammam, A.M. Fekry, M.M. Saleh, Electrocatalytic oxidation of methanol on ordered binary catalyst of manganese and nickel oxide nanoparticles, *Int. J. Hydrogen Energy.* 40 (2015) 275–283. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.03.109.
- [48] Q. Zhou, A. Umar, E. Mehdi, A. Amine, L. Xu, Y. Gui, A.A. Ibrahim, R. Kumar, S. Baskoutas, Chemical Fabrication and characterization of highly sensitive and selective sensors based on porous NiO nanodisks, *Sensors Actuators B. Chem.* 259 (2018) 604–615. doi:10.1016/j.snb.2017.12.050.
- [49] M. Bilgi, E.M. Sahin, E. Ayranci, Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol, *J. Electroanal. Chem.* 813 (2018) 67–74. doi:10.1016/j.jelechem.2018.02.012.
- [50] M.M. Pereira Silva Neves, M.B. González-García, P. Bobes-Limenes, A. Pérez-Junquera, D. Hernández-Santos, F.J. Vidal-Iglesias, J. Solla-Gullón, P. Fanjul-Bolado, A non-enzymatic ethanol sensor based on a nanostructured catalytic disposable electrode, *Anal. Methods.* 9 (2017) 5108–5114. doi:10.1039/C7AY01078H.

-
- [51] H. Nakamura, R. Tanaka, K. Suzuki, M. Yataka, Y. Mogi, A direct determination method for ethanol concentrations in alcoholic beverages employing a eukaryote double-mediator system, *Food Chem.* 117 (2009) 509–513. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.026.
- [52] S.R. Chinnadayala, A. Kakoti, M. Santhosh, P. Goswami, A novel amperometric alcohol biosensor developed in a 3rd generation bioelectrode platform using peroxidase coupled ferrocene activated alcohol oxidase as biorecognition system, *Biosensors and Bioelectronics.* 55 (2014) 120–126. doi:10.1016/j.bios.2013.12.005.
- [53] S. Preecharueangrit, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, A. Numnuam, Amperometric sensing of sulfite using a gold electrode coated with ordered mesoporous carbon modified with nickel hexacyanoferrate, *J. Electroanal. Chem.* 808 (2018) 150–159. doi:10.1016/j.jelechem.2017.11.070.
- [54] C. Ruiz-Capillas, F. Jiménez-Colmenero, Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review, *Food Chem.* 112 (2009) 487–493. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.085.
- [55] A. Isaac, J. Davis, C. Livingstone, A.J. Wain, R.G. Compton, Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 589–598. doi:10.1016/j.trac.2006.04.001.

Capítulo 5

Aptasensor impedimétrico para la
cuantificación de trombina
humana basado en el uso de
nanopartículas anisotrópicas de
oro

Capítulo 5

5.1. Introducción

5.1.1. Nanopartículas anisotrópicas de oro: *nanorods*

Los nanomateriales metálicos, en particular las nanopartículas de oro (NPsAu), han despertado considerable interés en diferentes campos de la ciencia debido a sus propiedades fisicoquímicas, ópticas y electrónicas únicas; la relativa facilidad de síntesis y la interesante posibilidad de modificación superficial con diferentes grupos químicos y moléculas [1,2]. Además, puesto que son nanomateriales biocompatibles y gracias a las amplias posibilidades de funcionalización que poseen, son excelentes candidatos para aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina, especialmente en la administración de fármacos [1–4]. La aplicación de NPsAu en el área de los biosensores electroquímicos es de suma importancia, principalmente debido a la biocompatibilidad, estabilidad química, aumento del área de superficial y la capacidad de incrementar la velocidad de transferencia de electrones que exhiben dichas nanopartículas [5–8].

Las características intrínsecas de las nanopartículas, pueden modificarse cambiando algunas de sus propiedades como su forma, tamaño, relación de aspecto (RA= longitud/ancho) o modificando su entorno químico. Por lo tanto, las propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas de las NPsAu anisotrópicas son diferentes, e incluso pueden ser superiores a las nanopartículas esféricas de oro [2,9].

Las nanobarras de oro (NRsAu, por su nombre en inglés *nanorods*) son nanopartículas alargadas, cuya relación de aspecto es mayor que 1, generalmente

entre 3 y 5, y presentan forma de barras o rodillos. A causa de su forma anisotrópica, cuando se encuentran bajo la acción de un campo electromagnético, experimentan efectos de resonancia y muestran dos picos o bandas espectrales bien separadas. Éstas se encuentran en las regiones del visible y el infrarrojo cercano, y se corresponden con la resonancia del plasmón superficial longitudinal (LSPR) y transversal (TSPR), es decir la resonancia provocada por la oscilación de los electrones a través del eje longitudinal (largo) y el eje transversal (corto) de los NRsAu, respectivamente [2–4,10]. La longitud de onda en la que aparece posicionado el pico longitudinal, que se corresponde con la LSPR, se ve afectada fuertemente por la relación de aspecto, la longitud que poseen los NRsAu y las condiciones de contorno [10,11]. Por lo tanto, los espectros de absorción UV-VIS pueden ser utilizados para la caracterización morfológica de NRsAu. En la **Figura 5-1** se esquematiza la interacción de los NRsAu bajo la acción de un campo electromagnético aplicado y sus correspondientes bandas de resonancia en la zona visible del espectro electromagnético.

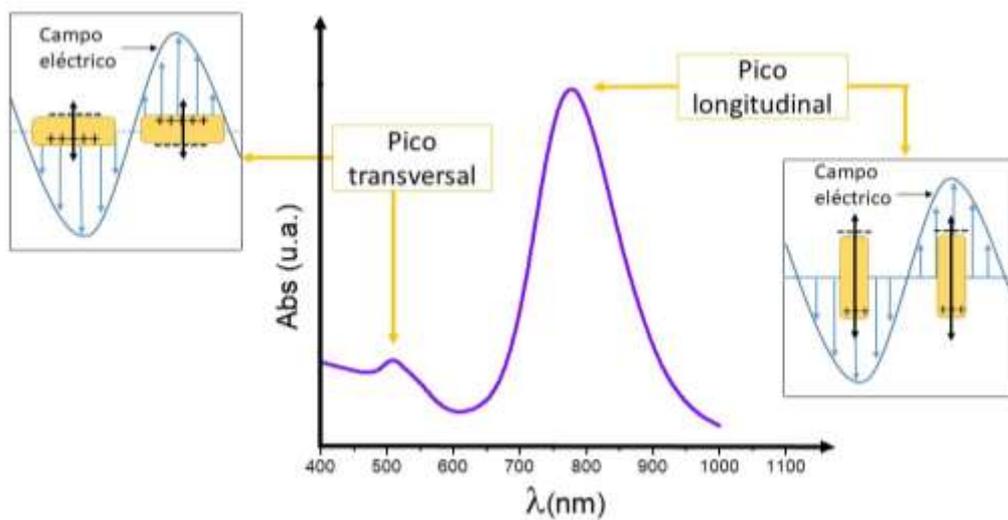


Figura 5-1. Espectro típico de absorción de nanopartículas anisotrópicas de oro y su interacción con el campo electromagnético dependiendo de su orientación.

El primer método propuesto para la obtención de NRsAu fue mediante síntesis electroquímica en el año 1997, basada en la utilización de un ánodo de oro y un cátodo de platino, ambos electrodos sumergidos en una solución conteniendo un surfactante [11]. En la actualidad, los métodos más utilizados para la síntesis de NPs anisotrópicas son de diversa naturaleza. Entre ellos se puede mencionar la reducción electroquímica de iones de oro dentro de los poros de una membrana utilizada como molde, donde se obtienen NRsAu policristalinos y en cantidades limitadas; métodos de síntesis química utilizando solventes orgánicos, que generalmente conducen a morfologías muy diferentes incluyendo nanohilos ultrafinos; y en solventes acuosos mediada por semillas utilizando surfactantes como agentes de crecimiento unidireccional [3,12]. Este último método, fue el que adquirió mayor importancia en los últimos años debido a la baja complejidad y alto rendimiento, y la versatilidad para la obtención de diferentes tamaños de nanoestructuras, según se desee. Este método fue el utilizado para la síntesis de NRsAu en el presente capítulo de tesis.

5.1.2. Inmovilización de nanopartículas

Como fue expuesto en el capítulo 1, en un biosensor electroquímico la señal es generalmente proporcional al cubrimiento superficial. La mayoría de los métodos utilizados para incrementar la sensibilidad de los biosensores “*label-free*” se basan en la modificación de la superficie para amplificar la señal observada. Uno de los métodos ampliamente utilizados es el anclaje covalente o no covalente de NPs, lo cual conduce a un incremento del área superficial y por lo tanto un aumento en la sensibilidad analítica [13–17].

Las NPs de oro son muy utilizadas en el desarrollo de biosensores, particularmente en aquellos basados en transducción óptica y electroquímica, ya que les aportan sus notables características como alta conductividad, biocompatibilidad y excelentes propiedades catalíticas [18]. Asimismo, las NPsAu

inmovilizadas ofrecen una importante superficie estructural, no sólo amplificando la respuesta eléctrica, sino que también proporcionan una plataforma adecuada para la posterior funcionalización con una amplia gama de ligandos orgánicos o biológicos (como por ejemplo ADN, aptámeros, entre otros) para la detección selectiva de ciertas moléculas blanco de interés biológico, clínico y ambiental [15,19–21].

Las nanopartículas se pueden anclar sobre la superficie de electrodos a través de la utilización de diferentes metodologías: por deposición física, por formación de enlaces covalentes, o electrodeposición directa desde el precursor metálico [22]. Una de las estrategias utilizadas para la inmovilización de nanopartículas es la funcionalización de superficies con moléculas orgánicas, a través de la formación de monocapas autoensambladas (SAMs, del inglés *Self-assembled monolayers*) [23]. Las SAMs son utilizadas como punto de partida para la construcción de estructuras supramoleculares, debido a que éstas se emplean para asignar a la superficie ciertas propiedades físicas o químicas deseadas, a través del grupo terminal que posea la molécula tiolada [24,25].

Los tioles se adsorben espontáneamente sobre metales de transición como plata, platino, paladio entre otros; sin embargo, la adsorción de tioles sobre oro forma un enlace excepcionalmente fuerte, lo que hace que este sistema sea el más estudiado para la formación de monocapas [25,26]. Los tioles son capaces de organizarse espontáneamente formando enlaces covalentes con la superficie de oro, y además gracias a las interacciones intermoleculares (del tipo de fuerzas de Van der Waals o interacciones π) se origina una estructura ordenada, compacta y estable [26].

Las técnicas utilizadas para la obtención de SAMs sobre superficies metálicas consisten en la deposición química desde fase vapor o a partir de la inmersión de sustratos de oro en soluciones de diversos precursores, tales como

tioles o disulfuros. Este último es el método más utilizado para la preparación de SAMs, debido a su escasa complejidad y a su bajo costo [26,27] .

En la monocapa formada pueden distinguirse tres regiones:

- **grupo funcional de anclaje:** responsable de enlazar químicamente la molécula al sustrato;
- **esqueleto o grupo espaciador:** constituido por las cadenas alquílicas o grupos aromáticos que separan el grupo funcional terminal del sustrato y promueven, mediante fuerzas de interacción laterales, el ordenamiento de la monocapa;
- **grupo funcional terminal:** define las propiedades de la interfaz entre la SAM y el medio. Las propiedades de adhesión, fricción, mojado, y densidad de carga de la superficie son controladas y modificadas por medio de este grupo [28,29].

En la **Figura 5-2** se muestra un esquema de una SAM ideal de tioles sobre un sustrato de oro.

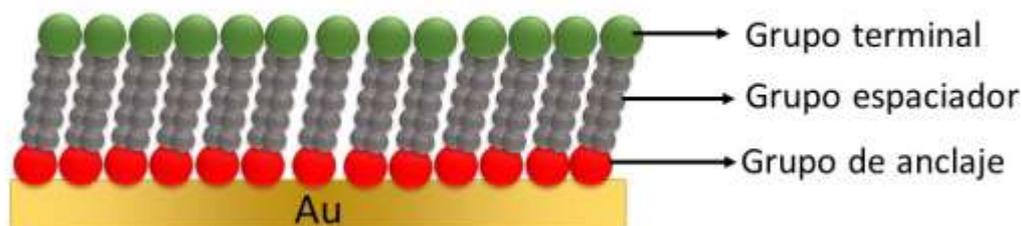


Figura 5-2. Esquema de SAMs de tioles sobre Au.

Recientemente se ha demostrado que las monocapas de ditioles aromáticos son de alta calidad y mayor organización que las SAMs de alcanoditioles, debido a su mayor conductividad y baja flexibilidad. En particular, se ha encontrado que el 4,4'-bifenilditiol (BPDT), en comparación con las

moléculas de alcanotiol, es más conductor y forma una monocapa con una configuración molecular vertical, probablemente debido a la estructura rígida de los anillos fenólicos y al apilamiento molecular a causa de las interacciones $\pi-\pi$. [22,30,31].

Un inconveniente que surge en la preparación de SAMs de ditioles es la formación de enlaces disulfuro, favoreciendo la formación de capas múltiples [29]. Uno de los parámetros que desempeña un papel crucial en la calidad de la capa formada, es la concentración de la solución de tiol. La formación de monocapas ordenadas generalmente se obtiene con soluciones diluidas, mientras que una alta concentración favorece la formación de multicapas [26,32]. Una estrategia para prevenir la formación de enlaces S-S es la utilización de agentes reductores, como por ejemplo D-L-ditiotreitol (DDT) o tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), donde se observa que la calidad de la monocapa mejora sustancialmente [29]. En este trabajo de Tesis se utilizó BPDT y TCEP, debido a que tales monocapas dejan expuestos grupos de terminales -SH, se convierten en una interesante plataforma para la inmovilización covalente de nanopartículas metálicas [29,33-36]

5.1.3. Aptámeros como molécula de bio-reconocimiento.

Como fue expresado en el **apartado 1.3** los aptámeros son herramientas moleculares altamente versátiles que pueden emplearse en el diseño de biosensores de afinidad [37-47]. Cuando los aptámeros son usados como elemento de reconocimiento biológico, la plataforma de biorreconocimiento desarrollada adquiere el nombre de aptasensor [38,41,47].

Dentro del universo de los aptámeros, los dirigidos contra α -trombina humana (denominados aptámeros anti- α -trombina humana, ApT) en particular, son biomoléculas de alto interés para uso clínico, debido a su capacidad para reconocer y unirse con gran especificidad a la molécula *target*. Entre ellos, el

aptámero de ADN de 15 bases (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), ha sido ampliamente estudiado para su uso en aptasensores desde su descubrimiento en 1992 [40,48–51]. Se ha demostrado que dicho aptámero forma un cuadruplex, dispuesto en una estructura similar a una silla (**Figura 5-3**). Esta estructura tiene una gran influencia en el proceso de unión y por lo tanto en la inhibición de la actividad de trombina, pudiendo emplearse como una alternativa farmacológica en el tratamiento de la trombosis [52–54].

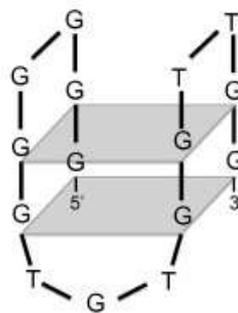


Figura 5-3. Representación esquemática de la estructura cuádruplex del aptámero anti-trombina [52].

5.1.4. α -Trombina humana

La trombina es una enzima del tipo serina proteasa, formada por dos cadenas de polipéptidos unidas por un puente disulfuro. Es una glicoproteína con un peso molecular de 36,7 KDa, un punto isoeléctrico de 7,05 [55] y se encuentra estrechamente vinculada con los procesos de coagulación sanguínea [48,52]. Esta proteína no se encuentra presente en la sangre, sino que se forma como parte del proceso de coagulación a partir de una proenzima, la protrombina. Una vez formada, esta enzima inicia la coagulación hidrolizando el fibrinógeno, activando las plaquetas sanguíneas y un conjunto de factores pro-coagulantes del plasma [48]. Se cree que juega un papel importante en un gran número de enfermedades cardiovasculares. Además, regula muchos procesos en la inflamación y la reparación del tejido de la pared de los vasos sanguíneos. En condiciones

fisiológicas la concentración de α -trombina en sangre humana puede variar desde unos pocos nanomoles por litro hasta unos cientos de nanomoles por litro (cuando se activa la cascada de coagulación) [39]. Por ello es importante cuantificar esta proteína a nivel de trazas con alta sensibilidad [55]. Una particularidad de la trombina es que, a pesar de tener un punto isoeléctrico neutro, presenta una distribución asimétrica de las cargas en su superficie. Se distingue por una región de cargas negativas en el centro activo, rodeado de dos extensas áreas con carga positiva, debida fundamentalmente a la presencia de aminoácidos básicos. Estas dos regiones denominadas *exo-sitios* I (de unión a fibrinógeno) y II (de unión a heparina) le confieren a la proteína la especificidad por sus sustratos, cofactores e inhibidores. Se ha demostrado que los aptámeros anti-trombina no interactúan con el sitio activo de la trombina sino con los dos *exo-sitios* I y II [52]. Particularmente, el aptámero de ADN de 15 bases que se une al *exo-sitio* I, actúa con eficacia en la inhibición de la formación de trombos plaquetarios [40,50,53].

La estructura terciaria de la α -trombina humana se muestra en la **Figura 5-4**, destacando los *exo-sitios* I y II de interacción con fibrinógeno y heparina, respectivamente.

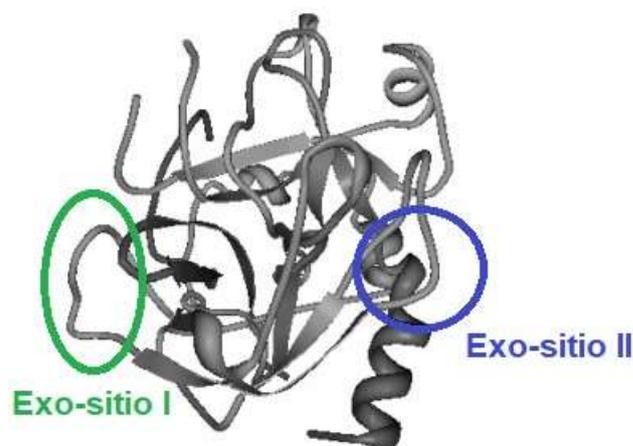


Figure 5-4. Representación de la estructura terciaria de la α -trombina, donde se muestran los *exo-sitios* I y II [52]

En este capítulo se presentan los resultados de la síntesis de nanopartículas anisotrópicas de oro en forma de barras o *nanorods* (NRsAu) y su aplicación en el diseño de un aptasensor impedimétrico para la detección y cuantificación de α -trombina humana (TRO_H). La construcción de la bio-plataforma de reconocimiento molecular está basada en la modificación de una superficie de oro con una monocapa de 4,4'-bifenilditiol (BPDT) cuyos grupos tioles expuestos en la superficie permitieron el posterior anclaje de los NRsAu por unión covalente. Luego, el aptámero anti- α -trombina humana (ApT), modificado con un grupo tiol en su extremo 5', fue inmovilizado covalentemente sobre los NRsAu. Se determinaron los parámetros analíticos del sistema hacia la molécula *target*. Dicho sistema fue estudiado y caracterizado a través voltamperometría cíclica (CV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). La caracterización morfológica de NPsAu se realizó través de espectroscopia UV-Vis y microscopía de transmisión electrónica de barrido (TEM).

5.2. Metodología experimental

Para la síntesis de la nanopartículas anisotrópicas de oro se utilizaron los siguientes reactivos: ácido cloroáurico (HAuCl₄·3H₂O, Tetrahedron), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB BioXtra, ≥99%, Sigma), borohidruro de sodio (NaBH₄, Tetrahedron), nitrato de plata (AgNO₃, Carlo Erba) y ácido ascórbico (AA, J.T. Baker). Una vez sintetizados los NRsAu se eliminó el exceso de CTAB centrifugando tres veces durante 20 min a 12500 g, y luego se almacenaron a 4°C.

En este trabajo se utilizaron electrodos de oro policristalino como transductores electroquímicos. Para el tratamiento de limpieza electroquímica se utilizó una solución de H₂SO₄ 0,50 M. El ácido sulfúrico fue proporcionado por J. T. Baker.

El 4,4'-bifenilditiol (BPDT) y la albúmina de suero bovino (BSA) fueron proporcionados por Sigma Aldrich, el tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) fue obtenido de Thermo Scientific. El aptámero anti- α -trombina humana (ApT) fue adquirido en Invitrogen Life Technologies. Éste es un ADN de simple hebra, con un grupo tiol y un espaciador de 6 timinas en su extremo 5' y está compuesto por 15 bases (PM= 6879,7 Da). La secuencia es la siguiente:

5'-SH-TTT TTT GGT TGG TGT GGT TGG-3' (ApT-SH)

La α -trombina humana fue proporcionada por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los *buffers* utilizados en las diferentes etapas de interacción biomolecular fueron: *buffer* fosfato (BP) 0,050 M pH 7,40; *buffer* fosfato salino (BPS) 0,050 M pH 7,40 NaCl 0,500 M; *buffer* fosfato-Tween 0,05 % (BPT) 0,050 M pH 7,40; *buffer* TRIS-HCl salino 0,050 M pH 7,40 NaCl 0,150 M KCl 0,010M MgCl₂ 0,010 M.

Para la preparación de los *buffers* se utilizó: fosfato monobásico de sodio y NaCl de Biopack, fosfato dibásico de sodio (Anhedra), MgCl₂ de Cicarelli, KCl, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) de J. T.Baker, polisorbato 20 ("Tween-20") de Parafarm.

Las mediciones electroquímicas se realizaron empleando los siguientes marcadores redox: K₃[Fe(CN)₆] y K₄[Fe(CN)₆], los cuales fueron proporcionados por Merk y NBS Biological, respectivamente y 1,4-benzoquinona (BQ) e hidroquinona (HQ), ambos adquiridos en Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin ninguna purificación previa. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente. Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura deionizada (MQ, $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), la cual fue obtenida a través de un sistema Milli-Q de Millipore.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Síntesis de nanopartículas anisotrópicas de oro

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, los *nanorods* de oro (NRsAu) fueron obtenidos a través de una síntesis química mediada por semillas en solución acuosa. Éste es el método más popular y comúnmente utilizado para la síntesis de NPs anisotrópicas en soluciones coloidales. La técnica consiste en la obtención de una solución con nanopartículas esféricas “semilla”, la cual luego es agregada a una solución de crecimiento que contiene una sal de oro, nitrato de plata, ácido ascórbico y CTAB, donde transcurrido un determinado tiempo las nanopartículas crecen en forma de barras o *nanorods*.

C. Murphy y colaboradores fueron pioneros en el desarrollo del método en el año 2001 [56,57], luego fue modificado por *Nikoobakht y El-Sayed* [58] en el año 2003, utilizando sólo CTAB como surfactante. El mismo permitió la obtención de NRs de tamaño y forma reproducible, minimizando la formación de nanopartículas esféricas como subproductos no deseados, lo cual era una de las mayores desventajas del método anterior. Modificaciones posteriores permitieron lograr la modulación de la forma, el tamaño y la pureza de los NRsAu, estudiando diferentes variables como por ejemplo la concentración de reactivos y la temperatura de reacción [59–65].

En este trabajo de Tesis se utilizó el protocolo publicado por *Jones y col.* [66] basado en el procedimiento modificado por *Nikoobakht y El-Sayed*. Dicho método consta de dos pasos, la elaboración de las semillas y la obtención de la solución de crecimiento.

- **Elaboración de semillas**

Para la obtención de semillas se agregaron 250 μL de una solución de HAuCl_4 (0,010 M) a 10,0 mL de una solución de CTAB (0,100 M) bajo agitación vigorosa y manteniendo la temperatura a 24°C. Luego, se adicionaron rápidamente a la solución anterior 600 μL de una solución de NaBH_4 (0,010 M), fría y recién preparada, manteniendo la agitación por 30 segundos. El hecho de que la solución de NaBH_4 esté fría es importante, debido a que esta especie es un poderoso agente reductor y reacciona exotérmicamente con el agua para generar hidrógeno, lo cual puede evitarse disminuyendo la temperatura. Por lo tanto, el NaBH_4 reaccionará con los iones de oro reduciéndolos a Au^0 , y por consiguiente, en este momento la solución cambia su color de amarillo a pardo. El borohidruro induce una rápida nucleación, dando como resultado una solución “semilla” de nanopartículas de oro esféricas monocristalinas [59,60,67]. Esta solución se dejó en reposo entre 30 minutos y 1 hora para que, si existe algún exceso de NaBH_4 , se descomponga, de modo tal que no reaccione en la solución de crecimiento [59].

- **Solución de crecimiento**

Para la preparación de la solución de crecimiento de *nanorods* se adicionó 2,5 mL de una solución de HAuCl_4 (0,010 M) a 100,0 mL de CTAB (0,100 M). La función del CTAB en esta reacción es formar micelas, atraídas por fuerzas electrostáticas, permitiendo la agrupación unidimensional de los átomos de Au. Seguidamente, a esta solución se le agregó 600 μL de AgNO_3 (0,010 M). Los iones de plata en la solución de crecimiento son necesarios para tener un alto rendimiento de NRsAu cortos, con una alta relación de aspecto (de 1 a 5), ya que se conoce que la concentración de Ag^+ controla las dimensiones de los *nanorods* de oro; en general, cuanto mayor sea la concentración de iones de plata, mayor será la relación de aspecto del NRs resultante, dado que favorece el crecimiento anisotrópico [68]. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de ácido ascórbico (AA,

0,100 M) a la solución anterior. Dado que el AA es un reductor débil, tras su adición ocurre la reducción de Au (III) a Au (I), evidenciado por el cambio de color, de amarillo a incoloro. Este es un paso muy importante, ya que es fundamental que el agente reductor no complete la reducción de Au(I) a Au(0), evitando la nucleación secundaria durante la etapa de crecimiento [67,69].

Por último, a esta solución se le añadieron 360 μL de la solución semilla preparada anteriormente, las cuales actúan como catalizadores para el paso de reducción final de Au (I) sobre su superficie [67]. Transcurridos unos 15-20 minutos la solución comienza a colorearse, evidenciando el crecimiento de las nanopartículas anisotrópicas.

La solución de crecimiento se mantuvo a 27°C durante 20h. En la **Figura 5-5** se muestra el esquema de la síntesis de los NRsAu.



Figura 5-5. Esquema de síntesis de los NRsAu en solución, siguiendo el método mediado por semillas.

Finalmente, la suspensión coloidal fue purificada por centrifugación (a 12500 g por 20 minutos), lavada y resuspendida en agua ultrapura para eliminar el exceso de CTAB. Este procedimiento se repitió tres veces, para eliminar la mayor cantidad de estabilizante en exceso, evitando la posible aglomeración de las nanopartículas de manera irreversible.

5.3.2. Caracterización de NRsAu

Para corroborar que la síntesis de NRsAu fue exitosa, y además caracterizar morfológicamente las nanopartículas, el producto de síntesis fue analizado mediante espectroscopia UV-Vis y microscopia de transmisión electrónica (TEM).

5.3.2-A. Espectroscopia UV-Vis

Debido a que las resonancias de los plasmones superficiales de las nanopartículas anisotrópicas de oro dependen en gran medida de su forma y dimensiones (tamaño y relación de aspecto) [70,71] se puede utilizar esta variable para caracterizarlas. Por lo tanto, la espectroscopia UV-Vis es una metodología útil como herramienta para caracterizar los NRsAu sintetizados. Puesto que los NRsAu presentan una banda de absorción característica correspondiente a la resonancia del plasmón superficial transversal (P_T) alrededor de (520 ± 10) nm y una banda correspondiente a la resonancia del plasmón longitudinal (P_L) entre 650 y 1300 nm [59,67,70–73], estas bandas se emplearon en el seguimiento de la síntesis y caracterización de los NRsAu obtenidos.

En la **Figura 5-6** se muestran los perfiles espectrofotométricos registrados a 30 minutos (—), 1h (—), 2h (—) y 20h (—) del comienzo de la síntesis junto con el espectro de absorción correspondiente a la solución semilla (—). Los

espectros se midieron utilizando una cubeta de cuarzo de 0,100 cm de paso óptico, entre 1000 y 300 nm.

En el espectro de la solución semilla, tomado unos 5 minutos después de preparada, se puede observar una banda de absorción a muy bajas longitudes de onda ($P_S=350 \pm 1$ nm). Con los resultados obtenidos y basados en la bibliografía, se puede inferir que el tamaño de estas nanopartículas es inferior a 4 nm [58,67].

Comparando los dos espectros a distintos tiempos de síntesis, se evidencia claramente que tanto la banda correspondiente al plasmón transversal ($P_T=510 \pm 1$ nm) como el longitudinal ($P_L=790 \pm 1$ nm), así como la absorción, se mantienen constantes para 2 h y 20 h de síntesis. Por consiguiente, se asume que la síntesis es completa a las 2 horas. Por lo tanto, este tiempo se consideró un tiempo óptimo para futuras síntesis.

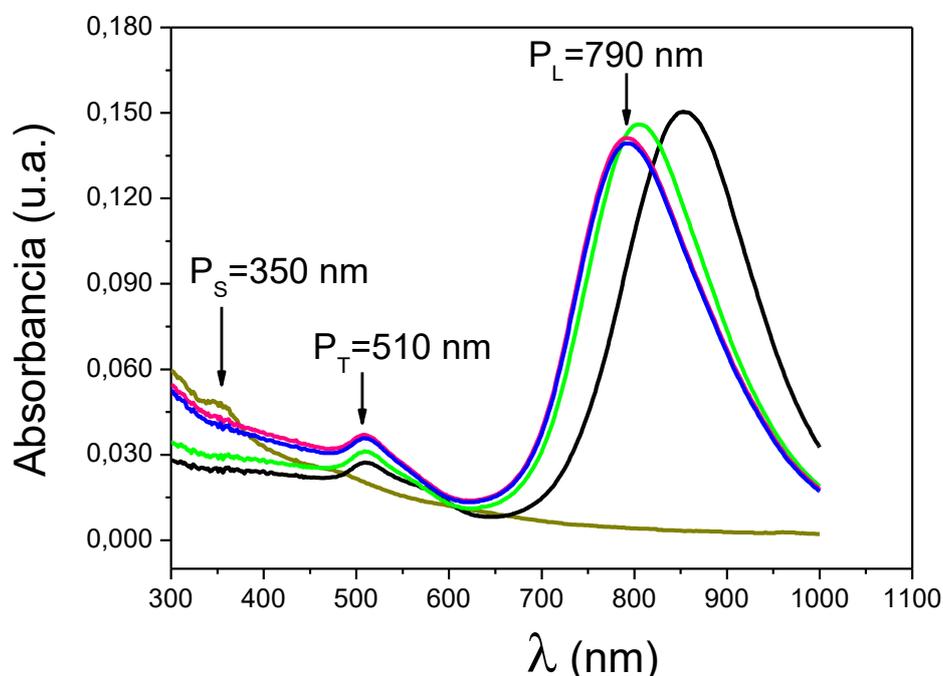


Figura 5-6. Espectros de absorción UV-vis de los de NRsAu para diferentes tiempos de síntesis: 30m (—), 1h (—), 2h (—) y 20h (—), y solución semilla (—). Paso óptico= 0,100 cm.

5.3.2-B. Caracterización TEM

La microscopía electrónica de transmisión fue utilizada para caracterizar las dimensiones de las nanopartículas anisotrópicas, así como evaluar la distribución de formas y tamaños. Las muestras fueron preparadas colocando una gota de la solución coloidal diluida en una rejilla soporte de cobre recubierta con Formvar/Carbon, de 200 mesh.

La **Figura 5-7 (A, B y C)** presenta las imágenes TEM de los NRsAu. Estas imágenes revelan que la distribución de forma y tamaño de los NRs sintetizados es altamente homogénea y que la cantidad de NPs esféricas es prácticamente despreciable.

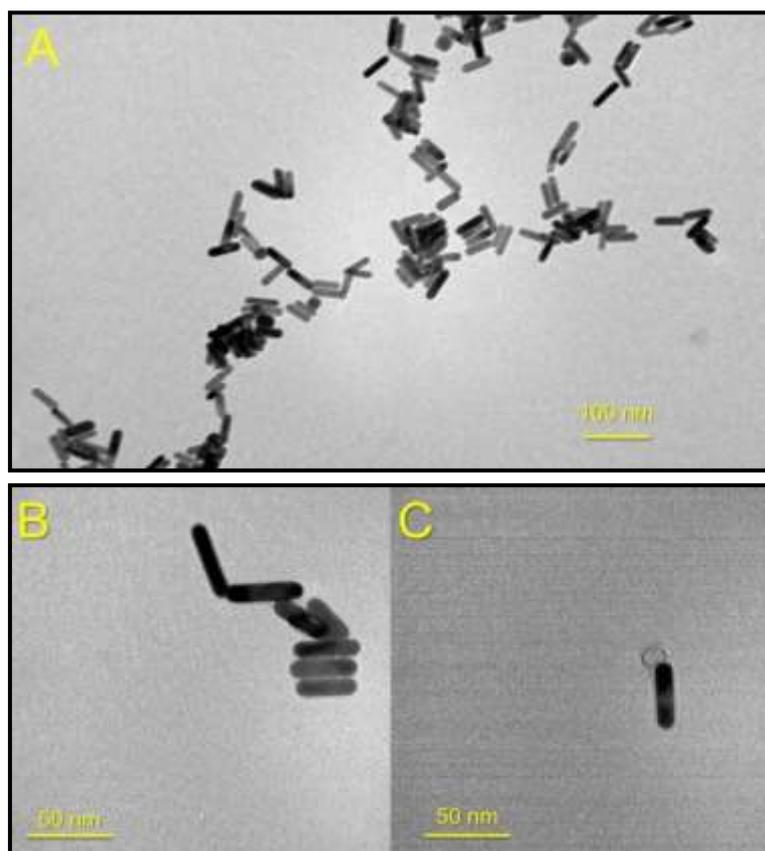


Figura 5-7. Imágenes TEM de *nanorods* de oro sintetizados a través del método mediado por semillas.

A partir del análisis de las micrografías se puede representar un histograma de distribución del tamaño de las NPs en función de la longitud, como se muestra en la **Figura 5-8**. La longitud y el ancho de las nanopartículas fue calculada a través de las imágenes TEM, utilizando el programa ImageJ, para un $n=50$. De este modo fue posible determinar que los NRsAu sintetizados tienen una longitud promedio de (43 ± 5) nm y un ancho de (10 ± 1) nm, con una relación de aspecto (longitud/ancho) de 4,3.

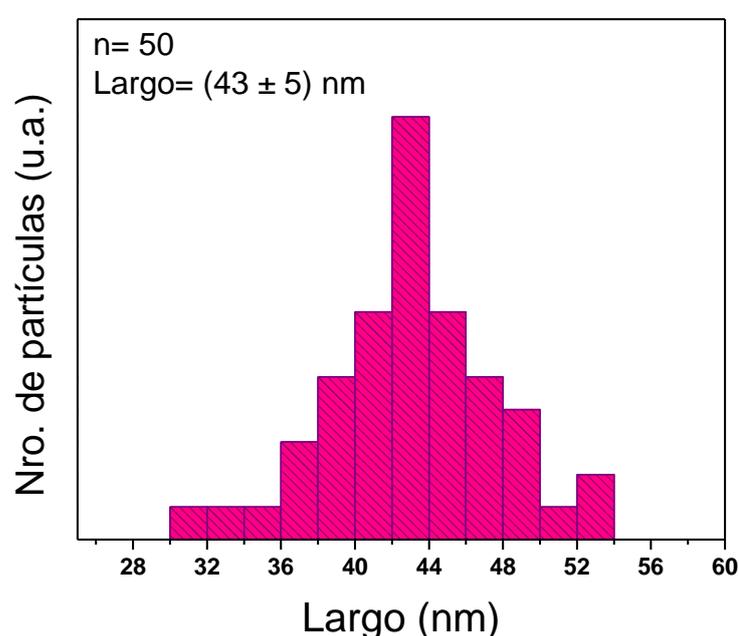


Figura 5-8. Histograma de distribución de tamaño de NRsAu obtenido a partir de las imágenes TEM.

Los datos sobre tamaño y forma obtenidos para estas NPs sintetizadas son similares a los reportados en bibliografía [66] y se correlacionan muy bien con el análisis de los espectros UV-Vis.

5.3.2-C. Determinación del potencial zeta

Se conoce que los *nanorods* sintetizados por el método utilizado en la presente tesis, son producidos con una bicapa de CTAB. La existencia de esta bicapa se ha respaldado experimentalmente por espectroscopia IR, análisis termogravimétrico y análisis de potencial zeta (ζ) [74,75]. Dicha bicapa, consiste en dos estratos de surfactante, uno asociado a la superficie del oro a través de los grupos amonio cuaternario, y el otro que expone estos grupos al medio acuoso. La formación de esta bicapa se ve favorecida energéticamente ya que las colas hidrofóbicas del surfactante interactúan entre sí, quedando expuestas las cabezas hidrofílicas a la interfaz nanopartícula-solvente [68]. De esta manera, el CTAB estabiliza las NPs otorgándoles una carga neta positiva, tal como se ilustra en la **Figura 5-9**.

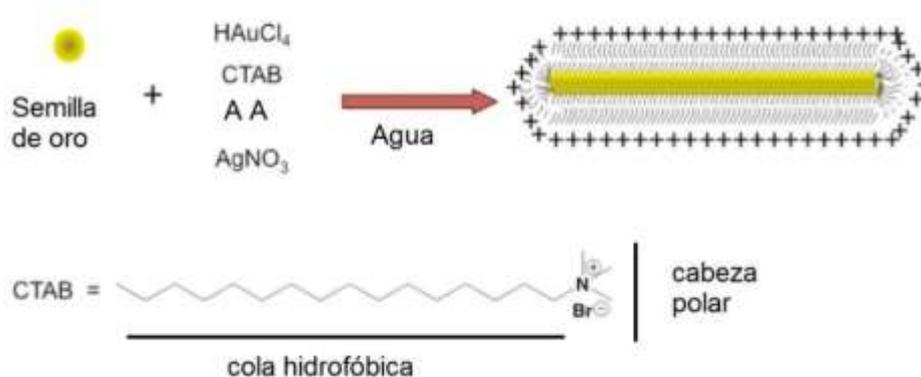


Figura 5-9. Esquema de síntesis de NRsAu, mostrando la bicapa de CTAB. Imagen tomada de referencia [68].

El potencial ζ de los NRsAu sintetizados fue determinado por dispersión dinámica de la luz (DLS) de la solución coloidal. El valor obtenido fue de $(+60 \pm 4)$ mV, el cual es concordante con valores reportados en bibliografía que van desde los +49 a los +71 mV dependiendo de la forma y el tamaño de la nanopartícula

[75]. Estos resultados demuestran que los NRsAu están cargados positivamente, incluso después del proceso de purificación.

5.3.3. Construcción de la plataforma de biorreconocimiento

En esta sección se presenta la caracterización electroquímica de los electrodos de oro en las diferentes etapas de modificación de la plataforma de biorreconocimiento, para su optimización y posterior detección de α -trombina humana, empleando voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).

5.3.3.1. Adsorción de BPDT sobre electrodos de oro policristalino

La monocapa del ditiol BPDT fue utilizada como plataforma precursora para la posterior inmovilización de los NRsAu sintetizados. Se evaluó el cubrimiento superficial de BPDT y se analizó el efecto de la concentración del ditiol, así como la utilización de TCEP.

En la **Figura 5-10** se esquematiza la reacción del grupo de anclaje.

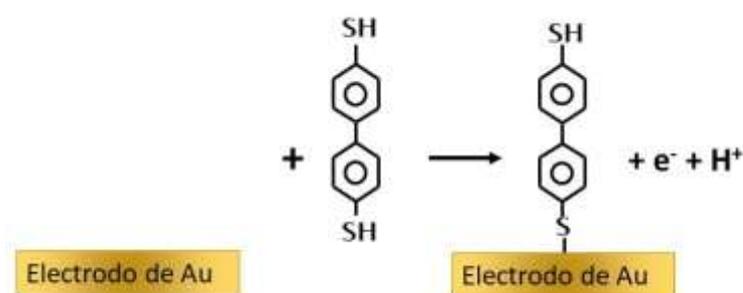


Figura 5-10. Esquema de reacción de BPDT sobre el sustrato de oro.

5.3.3.1-A. Optimización de la solución de BPDT

Para la preparación de las SAMs es muy importante que las superficies de oro estén limpias de material orgánico y libres de óxidos, por lo tanto, antes de comenzar con la modificación de los electrodos, éstos fueron pretratados tal como se describió en la **sección 2.4.2.1**.

La modificación inicial de la superficie se llevó a cabo por inmersión del electrodo de oro en una solución etanólica con distintas concentraciones de BPDT: 2, 20 y 200 μM y una solución de BPDT 200 μM con TCEP 4,0 mM. El tiempo de inmersión en todos los casos fue de 1 hora. Luego, los electrodos se retiraron de esta solución y se enjuagaron primero con una solución de etanol absoluto y luego con agua ultrapura.

Con el objetivo de estudiar la monocapa de BPDT, se realizaron experimentos de desorción reductiva para los electrodos modificados. Mediante voltamperometría lineal desde -0,300 a -1,400 V, utilizando KOH 0,10 M como electrolito soporte, a 0,100 V s^{-1} . La carga asociada al proceso de desorción (Q_d) se obtuvo integrando el área del pico catódico obtenido durante el proceso de desorción reductiva, según la **ecuación 2-11 (Capítulo 2)**. En la **Figura 5-11.A** se muestran los perfiles voltamperométricos para: 2 (—), 20 (—) y 200 μM (—) de BPDT y 200 μM de BPDT con 4,0 mM de TCEP (—). En la **Figura 5-11.B** se ilustra la Q_d en función de las distintas soluciones estudiadas, calculada a partir de los perfiles voltamperométricos mostrados en **A**.

Según ha sido reportado, la carga de desorción para una monocapa de tioles aromáticos adquiere un valor entre 45-55 $\mu\text{C cm}^{-2}$ [29]. Para las distintas concentraciones de BPDT estudiadas (2, 20 y 200 μM) se obtuvieron las siguientes Q_d : (31 \pm 4), (45 \pm 9), (70 \pm 8) $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente.

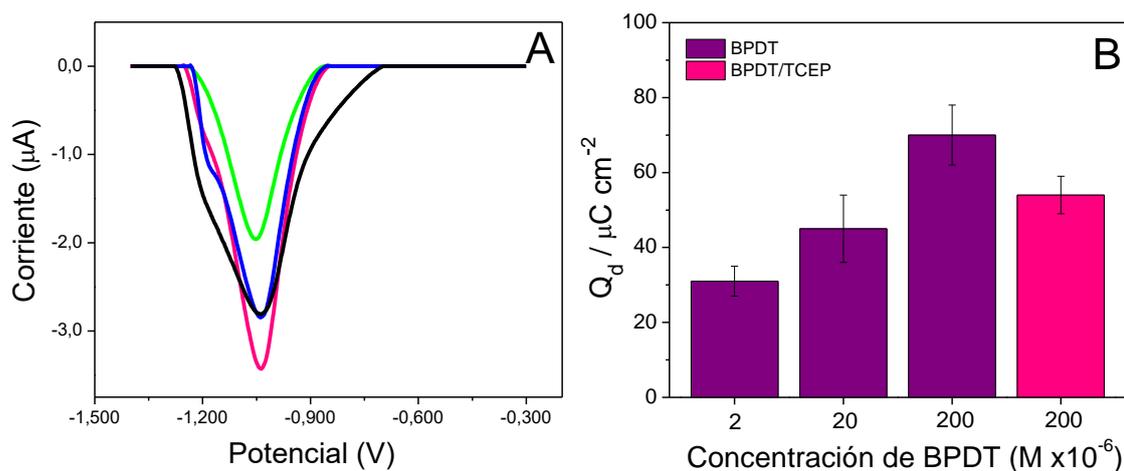


Figura 5-11. A. Perfiles voltamperométricos para: 2 (—), 20 (—) y 200 µM (—) de BPDT y 200 µM de BPDT con 4,0 mM de TCEP (—). Tiempo de inmersión: 1 hora. Electrolito soporte: KOH 0,10 M, V_b : 0,100 V s⁻¹. **B.** Carga de desorción de BPDT obtenida de los registros mostrados en **A**.

Del análisis de estos resultados, se puede concluir que a medida que aumenta la concentración de BPDT, se favorece la formación de enlaces S-S, y por lo tanto la multiplicidad de capas. Este efecto, además, se ve reflejado en los perfiles de los voltamperogramas mostrados en la **Figura 5-11.A**, donde para concentraciones más elevadas el pico de desorción es más ancho e incluso se puede visualizar la aparición de un hombro a potenciales más negativos. Si bien para la concentración más baja, 2 µM (—), se observa un único pico, el valor de la Q_d es menor que el esperado para una monocapa, lo que sugiere que no existe un cubrimiento total de la superficie. Por otra parte, cuando se utilizó TCEP en la solución de 200 µM BPDT, se obtuvo una carga de desorción de $(54 \pm 5) \mu\text{C cm}^{-2}$ y un único pico bien definido. Este valor se encuentra dentro del intervalo de valores esperados para la desorción de monocapas de tioles aromáticos, indicando que el empleo de TCEP evita la formación de múltiples capas de BPDT. Por lo tanto, se empleó la solución de 200 µM de BPDT con 4,0 mM de TCEP para la posterior modificación de los sustratos de oro, en la construcción de la plataforma de biorreconocimiento del aptasensor.

5.3.3.1-B. Cálculo del cubrimiento superficial

Con el fin de conocer el cubrimiento superficial (θ) de la SAM de BPDT, se realizaron experimentos de EIE. Mediante esta técnica, el cubrimiento superficial se puede calcular, teniendo en cuenta las resistencias de transferencia de carga (R_{tc}) a partir de la siguiente ecuación:

$$\theta = 1 - \frac{R_{tc}(Au)}{R_{tc}(tiol)} \quad \text{Ec.5-1}$$

donde $R_{tc}(Au)$ y $R_{tc}(tiol)$ corresponden a las resistencias de transferencia de carga de la superficie de oro sin modificar y la modificada con el tiol respectivamente [76].

En la **Figura 5-12** se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos para el electrodo de oro sin modificar (AuE, ●) y modificados con la SAM de BPDT (AuE/BPDT, ●). Los experimentos impedimétricos se realizaron en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 4,0 mM en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, a un potencial de +0,200 V, en el intervalo de frecuencias de $1,0 \times 10^{-1}$ a $1,0 \times 10^5$ Hz y aplicando una perturbación de 0,010 V. Los datos experimentales fueron ajustados a través de un circuito equivalente de Randles (mostrado en la figura insertada).

Del ajuste de los espectros impedimétricos se obtuvieron los valores de R_{tc} para AuE (26 ± 4) $\Omega \text{ cm}^2$ y para AuE/BPDT (295 ± 5) $\times 10^1 \Omega \text{ cm}^2$, donde puede observarse un notable incremento en el valor de R_{tc} debido al bloqueo superficial cuando el electrodo de oro se encuentra modificado con BPDT.

A partir de las R_{tc} obtenidas para cada plataforma, se calculó el cubrimiento superficial, obteniendo un valor de $\theta = 0,92$. Este valor indica que la superficie de oro está bloqueada casi en su totalidad por BPDT y presenta defectos en la monocapa [76].

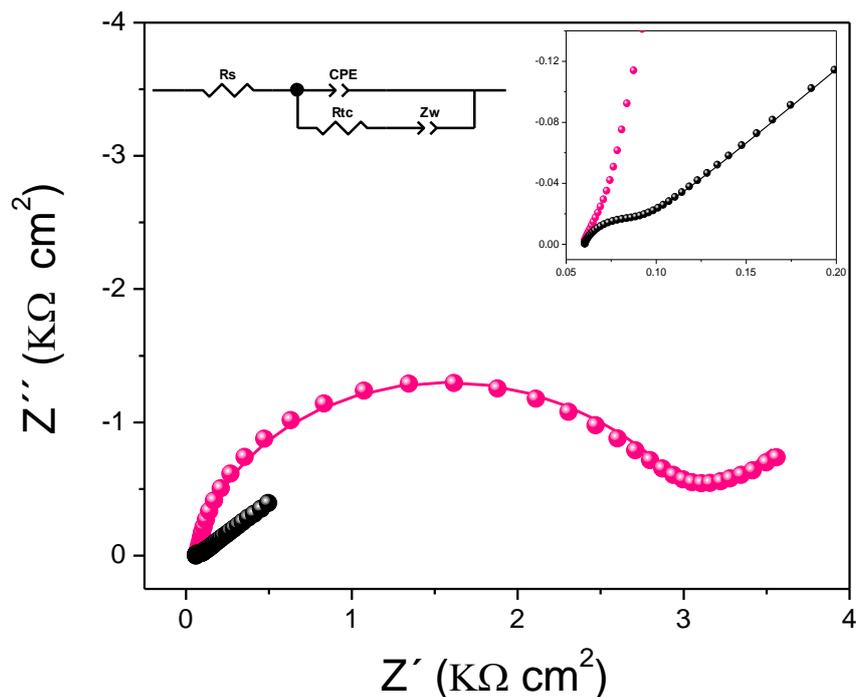


Figura 5-12. Diagramas de Nyquist obtenidos para los espectros de impedancia para el electrodo de oro sin modificar (●) y modificados con la SAM de BPDT (●) utilizando como marcador redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ 4,0 mM. Intervalo de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,200 V. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. En la **figura insertada** se muestra una ampliación del espectro para electrodo de oro sin modificar y el circuito de Randles utilizado para el ajuste de los datos experimentales.

5.3.3.2. Inmovilización de NRsAu sobre Au/BPDT

Una vez optimizada la plataforma Au/BPDT se siguió con la optimización del tiempo de interacción para la inmovilización covalente de los NRsAu sintetizados sobre la plataforma Au/BPDT (**Figura 5-13**).

La modificación fue realizada en cámara húmeda, para evitar la evaporación del solvente, depositando 30 μL de la solución coloidal de NRsAu sintetizados sobre los electrodos de oro modificados con la SAM de ditiol (Au/BPDT), luego del tiempo de interacción los electrodos fueron enjuagados con agua ultrapura y *buffer* fosfato salino. La caracterización electroquímica se llevó a cabo por EIE

empleando $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ como sonda redox, en las mismas condiciones experimentales de la **sección 5.3.3.1-B**.

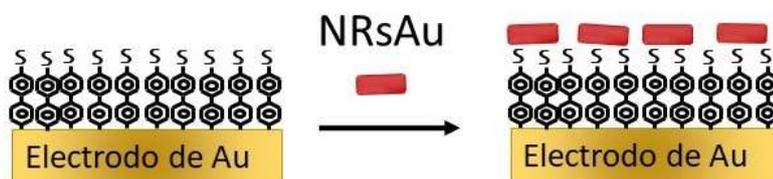


Figura 5-13. Esquema de inmovilización de NRsAu sobre Au/BPDT.

En la **Figura 5-14** se muestra la variación de la resistencia a la transferencia de carga en función del tiempo de interacción de los NRsAu con la plataforma AuE/BPDT. Los tiempos de interacción estudiados fueron 30, 45 y 60 minutos. Los datos experimentales fueron ajustados según el modelo del circuito eléctrico de Randles (**sección 2.1.4.1**).

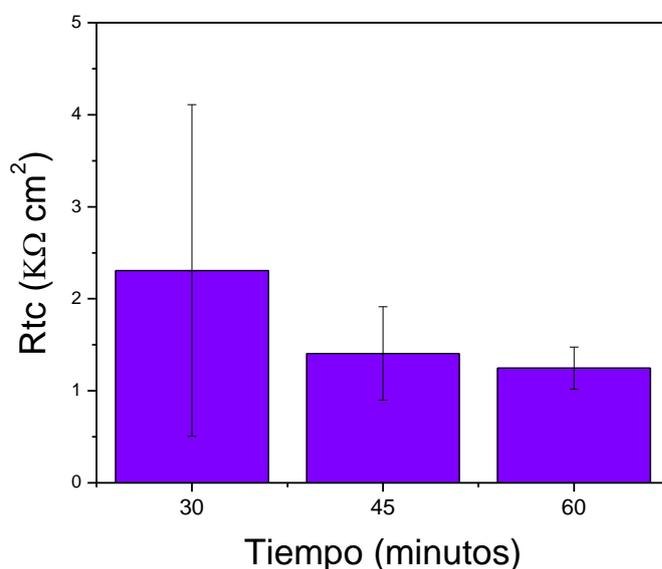


Figura 5-14. Resistencia a la transferencia de carga en función del tiempo de interacción de NRsAu con la plataforma AuE/BPDT, obtenida de los correspondientes espectros de impedancia.

De análisis de los resultados se puede inferir que, conforme aumenta el tiempo de interacción de los NRsAu con la plataforma modificada con BPDT, disminuye la R_{tc} , mejorando además la reproducibilidad, obteniéndose el menor valor de R_{tc} para el tiempo de 60 minutos. Se seleccionó este tiempo como óptimo para la inmovilización de los NRsAu.

En la **Figura 5-15**, se presentan los diagramas de Nyquist obtenidos para las distintas etapas de modificación: AuE (●), AuE/BPDT (●) y AuE/BPDT/NRsAu (●).

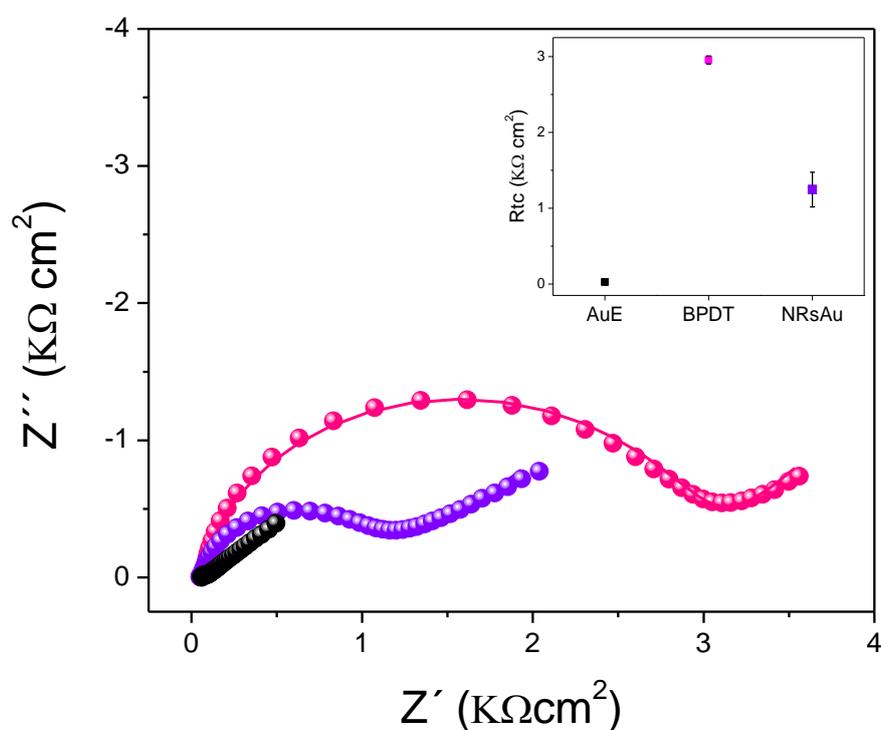


Figura 5-15. Diagramas de Nyquist obtenidos para los espectros de impedancia sobre AuE (●), AuE/BPDT (●) y AuE/BPDT/NRsAu (●) utilizando como marcador redox $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ 4,0 mM. Tiempo de interacción de NRsAu: 1 hora. Rango de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,200 V. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. Figura insertada: R_{tc} vs distintas etapas de modificación del sensor.

Si se compara la plataforma obtenida AuE/BPDT/NRsAu con AuE/BPDT, se observa una disminución en la R_{tc} , atribuida al carácter conductor y las propiedades catalíticas que poseen los NRsAu, por lo que se ve facilitada la

transferencia electrónica del marcador redox cuando las nanopartículas están ancladas en la superficie. Otra característica sobresaliente de esta plataforma es que, la presencia de los NRsAu aumenta el área superficial efectiva del electrodo, y por lo tanto la plataforma obtenida tiene la potencialidad de anclar un mayor número de moléculas de aptámero y de este modo se favorece la amplificación de la señal [55].

5.3.3.3. Inmovilización del aptámero anti-trombina humana

Después de optimizar el tiempo de interacción de los NRsAu para la obtención de la plataforma AuE/BPDT/NRsAu, la siguiente etapa para la construcción del aptasensor fue la inmovilización del aptámero anti-trombina (ApT-SH). Se determinó la concentración del ApT-SH a utilizar, para un tiempo de interacción de 1 hora. Se depositaron sobre los electrodos modificados con los NRsAu 30 μ L de las distintas soluciones de ApT-SH (25, 50, 75 y 100 ppm), preparados en BPS, en cámara húmeda (**Figura 5-16**).

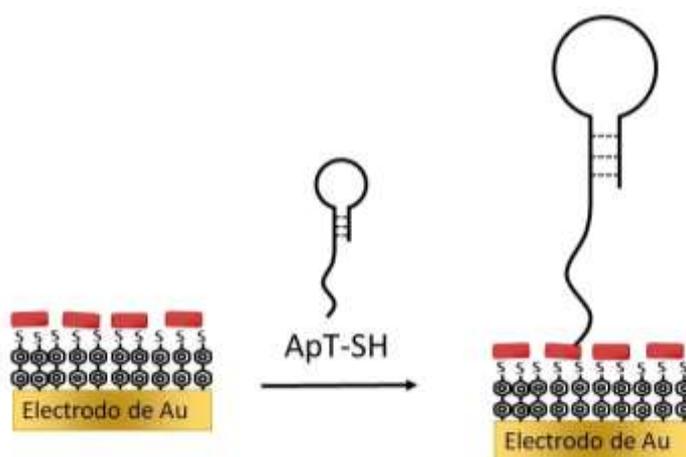


Figura 5-16. Esquema de inmovilización del aptámero anti-trombina sobre la plataforma AuE/BPDT/NRsAu.

La optimización de la concentración de ApT-SH se llevó a cabo por EIE empleando $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ como sonda redox, bajo las mismas

condiciones experimentales de la **sección 5.3.3.B**. Los resultados se muestran en la **Figura 5-17**, donde se ilustra la resistencia a la transferencia de carga en función de la concentración de aptámero sobre la plataforma AuE/BPDT/NRsAu. La R_{tc} (R_1+R_2) fue obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales, utilizando un circuito eléctrico equivalente mostrado en la figura insertada en la **Figura 5-17**. Tal circuito fue descrito en la **sección 2.1.4.1**.

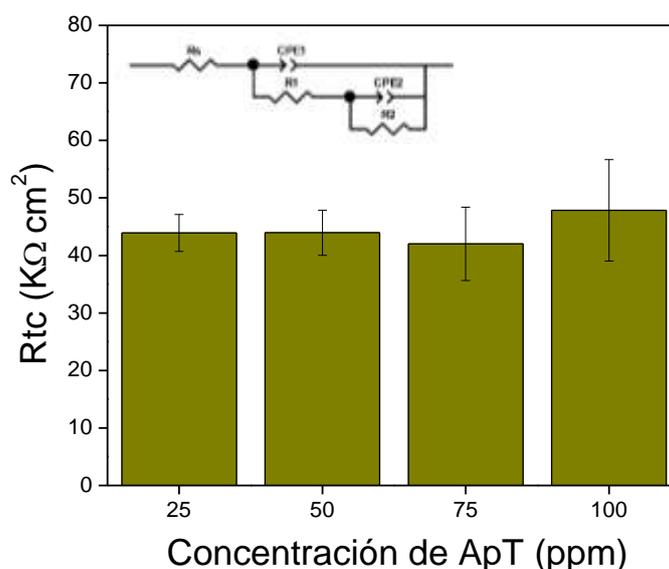


Figura 5-17. Resistencia a la transferencia de carga total en función de la concentración de aptámero (25, 50, 75 y 100 ppm) sobre AuE/BPDT/NRsAu, obtenida de los correspondientes espectros de impedancia. Figura insertada: circuito eléctrico equivalente utilizado para el ajuste de los datos.

Respecto a la optimización de la concentración de ApT-SH a utilizar, como se puede apreciar, la R_{tc} no varía sustancialmente con el incremento en la concentración de aptámero. Por lo tanto la mínima concentración (25 ppm) fue seleccionada como concentración óptima para la modificación de la superficie, teniendo en cuenta la relación costo-beneficio en la construcción del aptasensor.

En la **Figura 5-18.A** se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos para los espectros de impedancia sobre AuE (●), AuE/BPDT (●), AuE/BPDT/NRsAu (●) y AuE/BPDT/NRsAu/ApT (●) (condiciones experimentales **sección 5.3.3.B**). En la

Figura 5-18.B se muestran los valores de R_{tc} para cada etapa de modificación. Cabe destacar, el gran incremento de la R_{tc} para la plataforma AuE/BPDT/NRsAu/ApT en relación con la plataforma AuE/BPDT/NRsAu, lo que da cuenta de que el aptámero se encuentra eficientemente inmovilizado sobre la superficie.

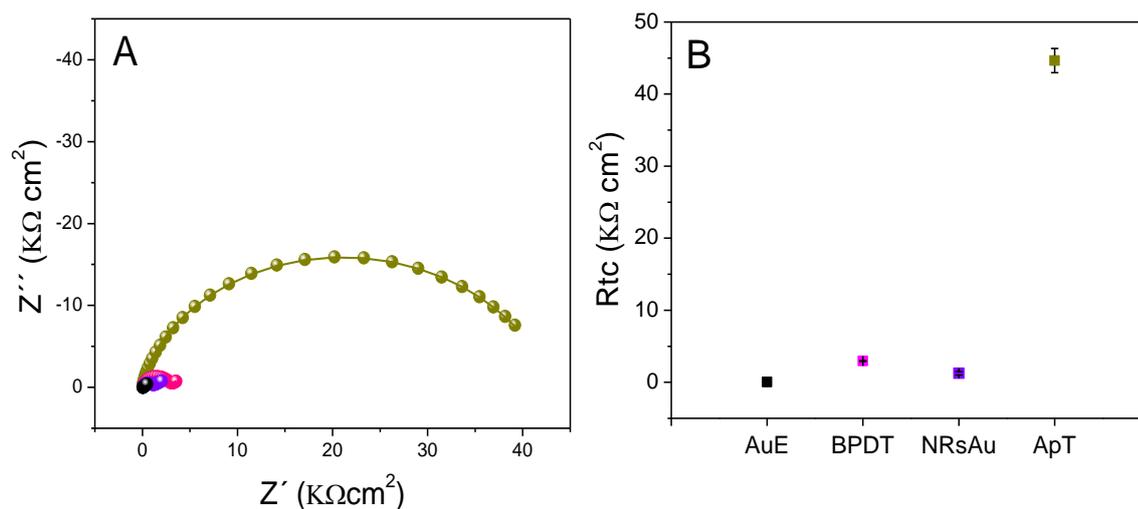


Figura 5-18.A. Diagramas de Nyquist obtenidos para los espectros de impedancia sobre AuE (●), AuE/BPDT (●), AuE/BPDT/NRsAu (●) y AuE/BPDT/NRsAu/ApT (●) utilizando como marcador redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ 4,0 mM. Concentración de ApT: 25 ppm. Rango de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,200 V. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M, pH 7,40. **B.** R_{tc} vs distintas etapas de modificación del biosensor.

En resumen, cuando la superficie de oro es modificada con el BPDT, la R_{tc} aumenta de $(2,6 \pm 0,4) \times 10^1 \Omega \text{cm}^2$ a $(2,95 \pm 0,05) \times 10^3 \Omega \text{cm}^2$, es decir, dos órdenes de magnitud mayor, debido al gran bloqueo superficial generado por la SAM. Luego de la inmovilización de los NRsAu, la R_{tc} disminuye notablemente a $(1,2 \pm 0,2) \times 10^3 \Omega \text{cm}^2$, como consecuencia de las características intrínsecas que poseen los NRsAu. Otro factor que también se debe tener en cuenta, es que los NRsAu exhiben una carga superficial positiva y podría establecerse una atracción de cargas con el marcador redox, ya que éste posee carga negativa. De esta manera, se facilita la transferencia electrónica de la sonda redox sobre la plataforma. Posteriormente, cuando el aptámero es inmovilizado sobre la superficie, se

observa un marcado incremento de R_{tc} ($4,4 \pm 0,1$) $\times 10^4 \Omega \text{ cm}^2$, debido al bloqueo generado por su anclaje sobre AuE/BPDT/NRsAu y posiblemente a causa de la repulsión de cargas entre la estructura del ApT, que presenta un alto contenido en grupos fosfato con carga negativa, y la sonda redox, por lo tanto se dificulta la reacción de transferencia electrónica.

El monitoreo de las distintas etapas en la construcción del aptasensor, también se evaluó mediante experimentos de voltamperometría cíclica, en presencia de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ en BP $0,050 \text{ M}$ pH $7,40$, a una velocidad de barrido de $0,100 \text{ V s}^{-1}$. Los voltamperogramas cíclicos se muestran en la **Figura 5-19**, sobre las distintas plataformas: AuE (—), AuE/BPDT (—), AuE/BPDT/NRsAu (—) y AuE/BPDT/NRsAu/ApT (—).

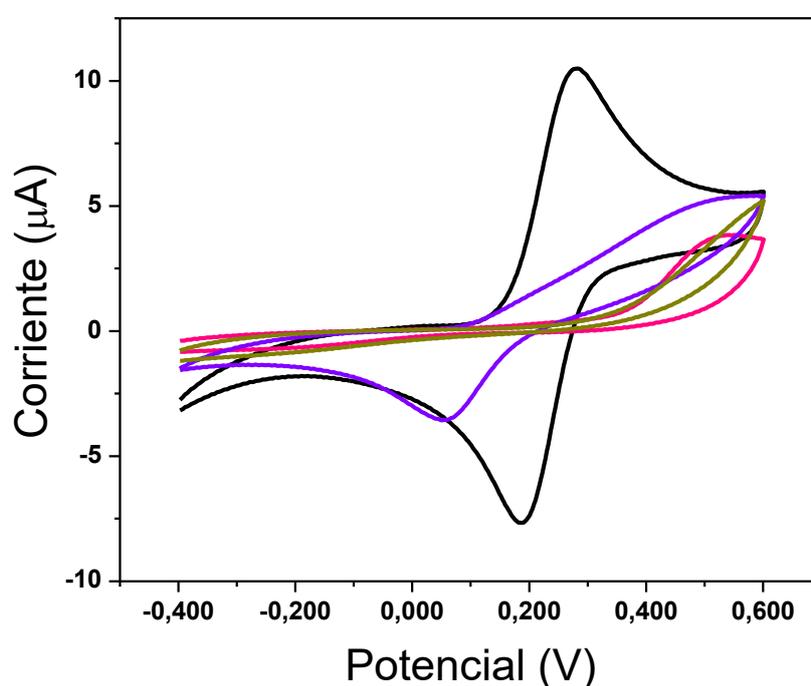


Figura 5-19. Voltamperogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre AuE (—), AuE/BPDT (—), AuE/BPDT/NRsAu (—) y AuE/BPDT/NRsAu/ApT (—). Electrolito soporte: BP $0,050 \text{ M}$ pH $7,40$. Velocidad de barrido: $0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Sobre el electrodo de oro sin modificar (AuE) se observa el típico comportamiento redox del ferricianuro. Posteriormente, cuando se modificó con el ditiol (AuE/BPDT) se observó un incremento de ΔE_p y una marcada disminución de ambas corrientes, lo que da cuenta de un gran bloqueo superficial. Cuando se inmovilizaron los NRsAu se obtuvo una reversión del comportamiento redox del ferricianuro, con disminución de los sobrepotenciales de oxidación y reducción y un incremento en la corriente de pico. Posteriormente, cuando se inmovilizó el aptámero (AuE/BPDT/ApT) se observó nuevamente un comportamiento bloqueante. Estas observaciones indican que fue efectiva la inmovilización en cada una de las etapas de la construcción de aptasensor. Estos resultados son ampliamente consistentes con los observados en EIE.

5.3.4. Aplicación analítica del aptasensor para la determinación de α -trombina

La plataforma de biorreconocimiento (AuE/BPDT/NRsAu/ApT), se empleó para el reconocimiento de α -trombina humana (TRO_H), tal como se encuentra esquematizado en la **Figura 5-20**. El procedimiento utilizado para la interacción se llevó a cabo colocando 30 μ L de las soluciones de trombina en la superficie del aptasensor por un tiempo de 30 minutos. Las soluciones de TRO_H fueron preparadas en *buffer* TRIS-HCl salino 0,050 M pH 7,40; NaCl 0,150 M; KCl 0,010M; MgCl₂ 0,010 M. Luego de la interacción del aptasensor con TRO_H, se efectuó el lavado con *buffer* fosfato-Tween 0,050 % 0,050 M pH 7,40, para eliminar las moléculas adsorbidas inespecíficamente y luego con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40.

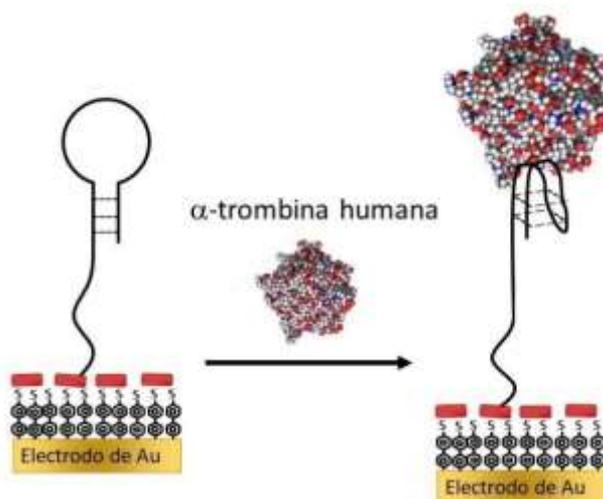


Figura 5-20. Esquema de interacción de trombina humana con el aptámero anti- α -trombina inmovilizado en la plataforma.

Se evaluó el rendimiento analítico del biosensor frente a la molécula blanco en las condiciones óptimas de análisis, registrando la dependencia del cambio en la R_{tc} frente a diferentes concentraciones de α -trombina humana, empleando benzoquinona/hidroquinona (BQ/HQ) como sonda redox. Esta cupla redox es neutra, y su mecanismo de reacción involucra el intercambio de dos electrones y dos protones. Además, como es un marcador de esfera interna, esta especie debe adsorberse sobre la superficie para que ocurra la transferencia de carga [77]. Es importante destacar que, BQ/HQ es altamente sensible al bloqueo superficial, minimizando los efectos electrostáticos que se observan cuando se utiliza un marcador redox cargado.

La **Figura 5-21** muestra la respuesta del aptasensor frente a diferentes concentraciones de TRO_H , representando la señal analítica como ΔR_{tc} ($R_{tc-TRO} - R_{tc-ApT}$) para la plataforma Au/BPDT/NRsAu/ApT en presencia de concentraciones crecientes de TRO_H . La R_{tc} fue obtenida a través del ajuste de los espectros impedimétricos experimentales con el circuito equivalente mostrado en la **sección 5.3.5**. Las mediciones de EIE se realizaron en presencia de BQ/HQ $4,0 \times 10^{-3}$ M en

BPS 0,050 M pH 7,40 aplicando un potencial de 0,050 V, en el intervalo de frecuencias de $1,0 \times 10^{-1}$ a $1,0 \times 10^5$ Hz y aplicando una perturbación de 0,010 V.

Como se puede observar ΔR_{tc} incrementa linealmente con el aumento de la concentración de TRO_H hasta una concentración de $1,20 \times 10^{-6}$ M, produciéndose luego una saturación del sistema. La regresión lineal arroja la siguiente expresión ($R^2= 0,993$):

$$\Delta R_{ct}(\Omega cm^2) = (2,41 \pm 0,09) \times 10^6 K\Omega cm^2 M^{-1} C_{TRO_H} + (2,69 \pm 0,04) K\Omega cm^2$$

En estas condiciones se encontró que el aptasensor exhibe un límite de cuantificación de $6,10 \times 10^{-9}$ M, el cual fue determinado experimentalmente y corresponde a la mínima concentración que es capaz de diferenciar de la señal del blanco.

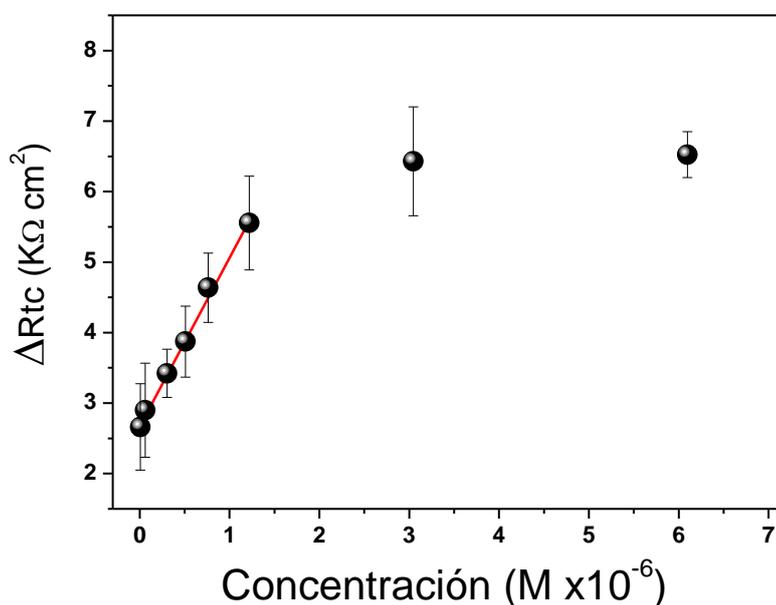


Figura 5-21. Curva de calibración para TRO_H obtenida a partir estudios de espectroscopia de impedancia electroquímica.

De los resultados obtenidos, se puede conocer la constante de disociación de la interacción aptasensor- α -trombina humana, si se considera que cada sitio de unión es equivalente y la capacidad de la molécula para unirse es independiente de las interacciones laterales. Basado en el modelo clásico de Langmuir, se muestra una forma linealizada de la isoterma de adsorción [55]:

$$\frac{C}{\Delta R_{tc}} = \frac{C}{(\Delta R_{tc})_{sat}} + \frac{K_D}{(\Delta R_{tc})_{sat}} \quad \text{Ec. 5-1}$$

En donde C es la concentración de trombina en solución, ΔR_{tc} es la señal observada, $(\Delta R_{tc})_{sat}$ es la señal de saturación del sensor y K_D es la constante de disociación. En la **Figura 5-22** se muestra el gráfico correspondiente a la isoterma de adsorción linealizada.

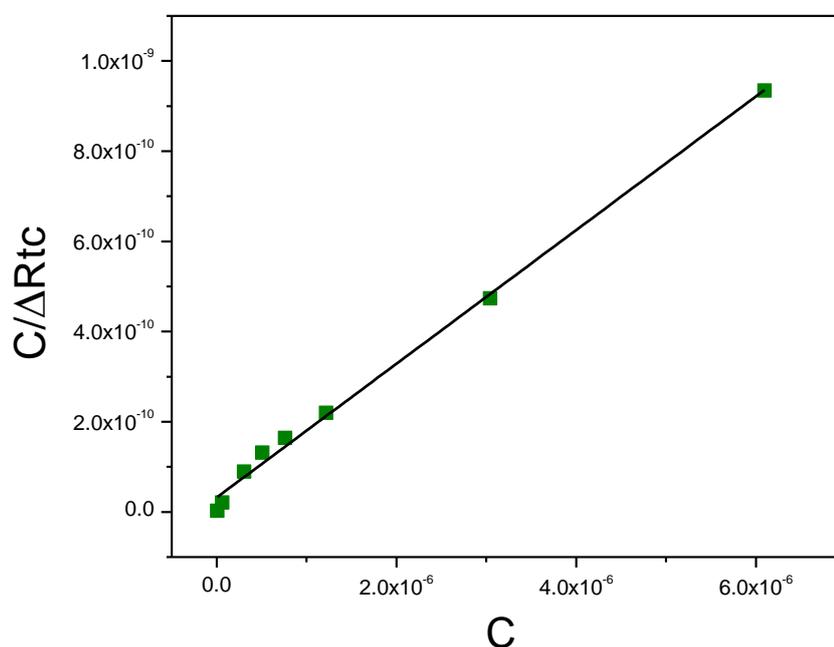


Figura 5-22. Isoterma de adsorción linealizada basada en el modelo de Langmuir. La línea continua muestra el ajuste lineal a los datos experimentales.

Los resultados experimentales se correlacionan linealmente con un coeficiente $R^2= 0,995$. El valor de K_D calculado es de 209 nM. Es importante remarcar que, dado que los valores de las constantes de disociación dependen fuertemente de las condiciones de trabajo, el valor hallado es consistente con los reportados para aptasensores en bibliografía que van de 20 a 200 nM [49,54].

5.1.4. Selectividad del aptasensor

Debido a que la TRO_H se encuentra presente en el suero sanguíneo junto a otras proteínas y la albúmina es la que se encuentra presente en mayor proporción, se evaluó la selectividad del aptasensor en presencia de albúmina sérica bovina (BSA). Esta proteína es muy utilizada en este tipo de ensayos, ya que posee una elevada analogía con la albumina humana. Los experimentos se realizaron mediante EIE, en las mismas condiciones de determinación de TRO_H (**Figura 5-23**). Para realizar la prueba se utilizó una concentración de BSA de $6,10 \times 10^{-8}$ M. A través de los valores de R_{tc} , mostrados en la figura insertada en la **Figura 5-23** se determinó que el porcentaje de interferencia fue del 4,7 %.

Por otra parte, en una segunda instancia se determinó la concentración de trombina en una mezcla TRO_H y BSA, para una concentración de ambas proteínas de $6,10 \times 10^{-9}$ M. Los valores de ΔR_{tc} se muestran a continuación en la **tabla 5-1**.

Por lo tanto, del análisis de estos resultados, se puede inferir que es posible cuantificar α -trombina humana en presencia de BSA en condiciones altamente selectivas.

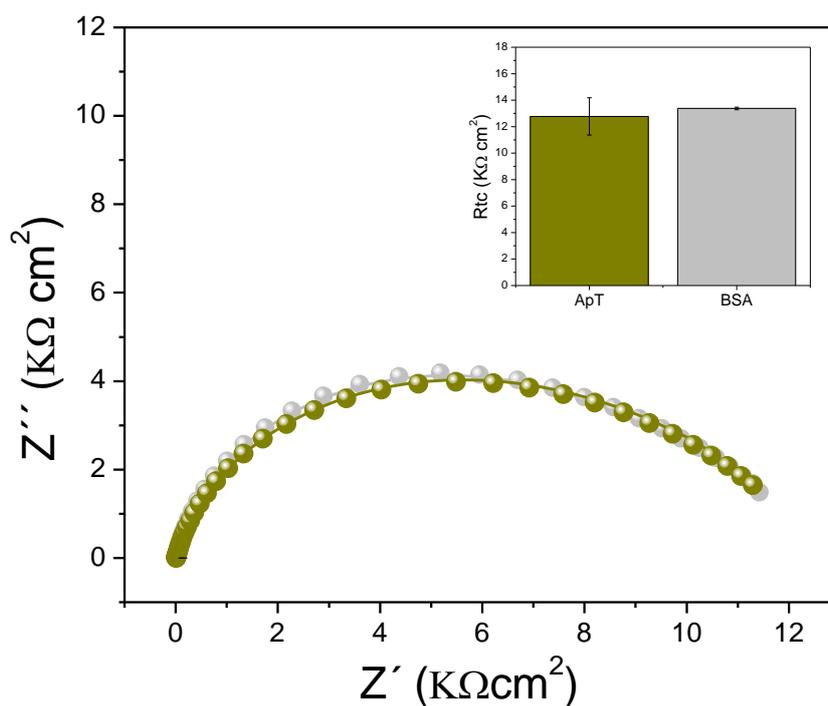


Figura 5-23. Diagramas de Nyquist obtenidos para los espectros de impedancia sobre AuE/BPDT/NRsAu/ApT en ausencia (●) y en presencia de BSA $6,10 \times 10^{-8}$ M (●). Marcador redox: BQ/HQ 4×10^{-3} M. Rango de frecuencia: $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^5$ Hz. Amplitud: 0,010 V. Potencial aplicado: 0,200 V. Electrolito soporte: *buffer* fosfato salino 0,050 M, pH 7,40. Figura insertada: muestra las resistencias absolutas a la transferencia de carga calculadas en ambos casos.

Tabla 5-1. Valores de resistencias obtenidos a partir de los espectros de EIE para las soluciones de α -trombina humana y mezcla de α -trombina humana y albúmina.

	ΔR_{tc} ($K\Omega$)
TRO _H	$(29 \pm 7) \times 10^2$
Mezcla BSA- TRO _H	$(30 \pm 5) \times 10^2$

5.4. Conclusiones

Se sintetizaron NRsAu eficientemente a través de una metodología sencilla y de bajo costo, como lo es el método mediado por semillas. A través de las distintas técnicas de caracterización se determinó que los NRsAu poseen una distribución de forma y tamaño sumamente homogénea.

Se diseñó y desarrolló un aptasensor impedimétrico para la cuantificación de α -trombina humana. Esto se logró a través de la formación de una monocapa de BPDT sobre una superficie de oro policristalino, utilizando TCEP como agente reductor, el cual evita eficientemente la formación de enlaces disulfuro y por lo tanto la generación de multicapas. Esta plataforma fue utilizada para la inmovilización covalente de los NRsAu sintetizados. Asimismo, el aptámero para α -trombina humana se inmovilizó eficientemente sobre la plataforma AuE/BPDT/NRsAu, conservando las propiedades de biorreconocimiento hacia su molécula blanco. De esta manera, mediante la utilización de esta plataforma biosensora se logró detectar α -trombina humana, a nivel nanomolar, en un amplio intervalo de concentraciones, obteniendo límites de detección comparables con los reportados por otros autores, demostrando una excelente reproducibilidad y sensibilidad, siendo además altamente selectivo en presencia de BSA.

5.5. Bibliografía

- [1] S. Laksee, S. Puthong, T. Teerawatananond, T. Palaga, N. Muangsin, Highly efficient and facile fabrication of monodispersed Au nanoparticles using pullulan and their application as anticancer drug carriers, *Carbohydr. Polym.* 173 (2017) 178–191. doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.101.

-
- [2] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta*. 184 (2018) 537–556. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088.
- [3] L. Vigderman, B.P. Khanal, E.R. Zubarev, Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications, *Adv. Mater.* 24 (2012) 4811–4841. doi:10.1002/adma.201201690.
- [4] N. Li, D. Niu, X. Jia, J. He, Y. Jiang, J. Gu, Z. Li, S. Xu, Y. Li, Multiple gold nanorods@hierarchically porous silica nanospheres for efficient multi-drug delivery and photothermal therapy, *J. Mater. Chem. B*. 5 (2017) 1642–1649. doi:10.1039/c6tb03020c.
- [5] Y. Zhang, M. Chen, H. Li, F. Yan, P. Pang, H. Wang, Z. Wu, W. Yang, A molybdenum disulfide/gold nanorod composite-based electrochemical immunosensor for sensitive and quantitative detection of microcystin-LR in environmental samples, *Sensors Actuators, B Chem.* 244 (2017) 606–615. doi:10.1016/j.snb.2017.01.030.
- [6] Z. He, Y. Cai, Z. Yang, P. Li, H. Lei, W. Liu, Y. Liu, A dual-signal readout enzyme-free immunosensor based on hybridization chain reaction-assisted formation of copper nanoparticles for the detection of microcystin-LR, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 151–159. doi:10.1016/j.bios.2018.10.033.
- [7] R. Tian, W. Ning, M. Chen, C. Zhang, Q. Li, J. Bai, High performance electrochemical biosensor based on 3D nitrogen-doped reduced graphene oxide electrode and tetrahedral DNA nanostructure, *Talanta*. 194 (2019) 273–281. doi:10.1016/j.talanta.2018.09.110.
- [8] M. Khater, A. de la Escosura-Muñiz, D. Quesada-González, A. Merkoçi, Electrochemical detection of plant virus using gold nanoparticle-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 1046 (2018) 123–131. doi:10.1016/j.aca.2018.09.031.

-
- [9] X. Zhang, Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications, *Cell Biochem. Biophys.* 72 (2015) 771–775. doi:10.1007/s12013-015-0529-4.
- [10] M. Valcárcel, Á.I. López-Lorente, Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry, Volume 66, Elsevier, 2014. doi:10.1016/B978-0-444-63285-2.00005-5.
- [11] Y. Yu, S. Chang, C. Lee, C.R.C. Wang, Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties.Pdf, *J. Phys. Chem. B.* 101 (1997) 6661–6664.
- [12] T. Ye, Z. Dai, F. Mei, X. Zhang, Y. Zhou, J. Xu, W. Wu, X. Xiao, C. Jiang, Synthesis and optical properties of gold nanorods with controllable morphology, *J. Phys. Condens. Matter.* 28 (2016). doi:10.1088/0953-8984/28/43/434002.
- [13] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 5848–5866. doi:10.1016/j.electacta.2008.03.005.
- [14] N.K. Mogha, V. Sahu, R.K. Sharma, D.T. Masram, Reduced graphene oxide nanoribbon immobilized gold nanoparticle based electrochemical DNA biosensor for the detection of: Mycobacterium tuberculosis, *J. Mater. Chem. B.* 6 (2018) 5181–5187. doi:10.1039/c8tb01604f.
- [15] L. Wang, T. Meng, G. Yu, S. Wu, J. Sun, H. Jia, H. Wang, A label-free electrochemical biosensor for ultra-sensitively detecting telomerase activity based on the enhanced catalytic currents of acetaminophen catalyzed by Au nanorods, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 53–58. doi:10.1016/j.bios.2018.09.098.
- [16] D. Chateau, A. Liotta, D. Gregori, F. Lerouge, F. Chaput, A. Desert, S. Parola, Controlled surface modification of gold nanostructures with functionalized silicon polymers, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 81 (2017) 147–153.

doi:10.1007/s10971-016-4116-y.

- [17] X. Du, L. Dai, D. Jiang, H. Li, N. Hao, T. You, H. Mao, K. Wang, Gold nanrods plasmon-enhanced photoelectrochemical aptasensing based on hematite/N-doped graphene films for ultrasensitive analysis of 17 β -estradiol, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 706–713. doi:10.1016/j.bios.2017.01.034.
- [18] S. Kempahanumakkagari, A. Deep, K.H. Kim, S. Kumar Kailasa, H.O. Yoon, Nanomaterial-based electrochemical sensors for arsenic - A review, *Biosens. Bioelectron.* 95 (2017) 106–116. doi:10.1016/j.bios.2017.04.013.
- [19] M. Matsishin, A. Rachkov, A. Lopatynskyi, V. Chegel, A. Soldatkin, A. El'skaya, Selective Amplification of SPR Biosensor Signal for Recognition of rpoB Gene Fragments by Use of Gold Nanoparticles Modified by Thiolated DNA, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 0–5. doi:10.1186/s11671-017-2031-y.
- [20] C. Ma, W. Li, Q. Kong, H. Yang, Z. Bian, X. Song, J. Yu, M. Yan, 3D origami electrochemical immunodevice for sensitive point-of-care testing based on dual-signal amplification strategy, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 7–13. doi:10.1016/j.bios.2014.07.014.
- [21] L. Wang, Q. Xiong, F. Xiao, H. Duan, 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 136–151. doi:10.1016/j.bios.2016.06.011.
- [22] P. Bollella, F. Mazzei, G. Favero, G. Fusco, R. Ludwig, L. Gorton, R. Antiochia, Improved DET communication between cellobiose dehydrogenase and a gold electrode modified with a rigid self-assembled monolayer and green metal nanoparticles: The role of an ordered nanostructuration, *Biosens. Bioelectron.* 88 (2017) 196–203. doi:10.1016/j.bios.2016.08.027.
- [23] D. García Raya, C. Silien, M. Blázquez, T. Pineda, R. Madueño, Electrochemical and AFM study of the 2D-assembly of colloidal gold

-
- nanoparticles on dithiol SAMs tuned by ionic strength, *J. Phys. Chem. C.* 118 (2014) 14617–14628. doi:10.1021/jp502692q.
- [24] C. Vericat, M.E. Vela, G. Corthey, E. Pensa, E. Cortes, M.H. Fonticelli, F. Ibanez, G.E. Benitez, P. Carro, R.C. Salvarezza, Self-assembled monolayers of thiolates on metals: a review article on sulfur-metal chemistry and surface structures, *RSC Adv.* 4 (2014) 27730–27754. doi:10.1039/c4ra04659e.
- [25] A.-E. Radi, J.L.A. Sánchez, E. Baldrich, C.K. O’Sullivan, Reusable Impedimetric Aptasensor complex formed between the aptamer and thrombin using, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6320–6323.
- [26] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing, *J. Solid State Electrochem.* 15 (2011) 1–24. doi:10.1007/s10008-011-1493-6.
- [27] D. Captao, B. Limoges, C. Fave, B. Schöllhorn, On the decisive role of the sulfur-based anchoring group in the electro-assisted formation of self-assembled monolayers on gold, *Electrochim. Acta.* 257 (2017) 165–171. doi:10.1016/j.electacta.2017.09.163.
- [28] E. Delamarche, B. Michel, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Thin Solid Films.* 273 (1996) 54–60. doi:10.1016/0040-6090(95)06768-X.
- [29] E.M. Euti, P. Vélez Romero, O. Linarez Pérez, G. Ruano, E.M. Patrito, G. Zampieri, E.P.M. Leiva, V.A. Macagno, F.P. Cometto, Electrochemical, HR-XPS and SERS study of the self-assembly of biphenyl 4,4'-dithiol on Au(111) from solution phase, *Surf. Sci.* 630 (2014) 101–108. doi:10.1016/j.susc.2014.07.021.
- [30] J. Liang, L.G. Rosa, G. Scoles, Nanostructuring, imaging and molecular manipulation of dithiol monolayers on Au(111) surfaces by atomic force microscopy, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 17275–17284.

doi:10.1021/jp076470y.

- [31] D. Matei, H. Muzik, A. Götzhäuser, A. Turchanin, Structural Investigation of 1,1'-biphenyl-4-thiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) by Scanning Tunneling Microscopy and Low Energy Electron Diffraction., *Langmuir*. 28 (2012) 1–7. doi:10.1021/la302821w.
- [32] N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1–12. doi:10.1016/S0956-5663(01)00277-9.
- [33] V.P. Devanarayanan, V. Manjuladevi, R.K. Gupta, Interaction of graphene with self assembled monolayers, *Macromol. Symp.* 357 (2015) 23–29. doi:10.1002/masy.201400180.
- [34] M. Riskin, B. Basnar, V.I. Chegel, E. Katz, I. Willner, F. Shi, X. Zhang, Switchable Surface Properties through the Electrochemical or Biocatalytic Generation of Ag Nanoclusters on Monolayer-Functionalized Electrodes Switchable Surface Properties through the Electrochemical or Biocatalytic Generation of Ag⁰ Nanoclusters on Mon, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 1253–60. doi:10.1021/ja0561183.
- [35] B. Li, M. Famili, E. Pensa, I.M. Grace, N.J. Long, C. Lambert, T. Albrecht, L. Cohen, Cross-plane Conductance through a Graphene/Molecular Monolayer/Au Sandwich, *Nanoscale*. 10 (2018) 19791–19798. doi:10.1039/C8NR06763E.
- [36] W. Khalid, M. El Helou, T. Murböck, Z. Yue, J.M. Montenegro, K. Schubert, G. Göbel, F. Lisdat, G. Witte, W.J. Parak, Immobilization of quantum dots via conjugated self-assembled monolayers and their application as a light-controlled sensor for the detection of hydrogen peroxide, *ACS Nano*. 5 (2011) 9870–9876. doi:10.1021/nn2035582.
- [37] G.T. Rozenblum, V.G. Lopez, A.D. Vitullo, M. Radrizzani, Aptamers: current

-
- challenges and future prospects, *Expert Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 127–135. doi:10.1517/17460441.2016.1126244.
- [38] M. Saberian-Borujeni, M. Johari-Ahar, H. Hamzeiy, J. Barar, Y. Omid, Nanoscaled aptasensors for multi-analyte sensing, *Bioimpacts.* 4 (2014) 205–215. doi:10.15171/bi.2014.015.
- [39] A. Gosai, B.S. Hau Yeah, M. Nilsen-Hamilton, P. Shrotriya, Label free thrombin detection in presence of high concentration of albumin using an aptamer-functionalized nanoporous membrane, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 88–95. doi:10.1016/j.bios.2018.10.010.
- [40] E. Alfinito, L. Reggiani, R. Cataldo, G. De Nunzio, L. Giotta, M.R. Guascito, Modeling the microscopic electrical properties of thrombin binding aptamer (TBA) for label-free biosensors, *Nanotechnology* 28 (2017). doi:10.1088/1361-6528/aa510f.
- [41] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Aptamer-based assay of biomolecules: Recent advances in electro-analytical approach, *Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 119–132. doi:10.1016/j.trac.2017.02.003.
- [42] M. Shahdordizadeh, S.M. Taghdisi, N. Ansari, F. Alebooye Langroodi, K. Abnous, M. Ramezani, Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*, *Sensors Actuators, B Chem.* 241 (2017) 619–635. doi:10.1016/j.snb.2016.10.088.
- [43] F. Chen, Y. Liu, C. Chen, H. Gong, C. Cai, X. Chen, Respective and simultaneous detection tumor markers CA125 and STIP1 using aptamer-based fluorescent and RLS sensors, *Sensors Actuators, B Chem.* 245 (2017) 470–476. doi:10.1016/j.snb.2017.01.155.
- [44] H. Sun, Y. Zu, Aptamers and their applications in nanomedicine, *Small.* 11 (2015) 2352–2364. doi:10.1002/sml.201403073.

- [45] M. Alagiri, P. Rameshkumar, A. Pandikumar, Gold nanorod-based electrochemical sensing of small biomolecules: A review, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 3069–3092. doi:10.1007/s00604-017-2418-6.
- [46] W. Tan, H. Wang, Y. Chen, X. Zhang, H. Zhu, C. Yang, R. Yang, C. Liu, Molecular aptamers for drug delivery, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 634–640. doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.009.
- [47] I. Palchetti, M. Mascini, Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3103–3114. doi:10.1007/s00216-012-5769-1.
- [48] V.A. Spiridonova, T.M. Novikova, D.M. Nikulina, T.A. Shishkina, E. V. Golubkina, O.S. Dyukareva, N.N. Trizno, Complex formation with protamine prolongs the thrombin-inhibiting effect of DNA aptamer in vivo, *Biochimie.* 145 (2018) 158–162. doi:10.1016/j.biochi.2017.09.010.
- [49] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature.* 355 (1992) 564–566. doi:10.1038/355564a0.
- [50] B. Deng, Y. Lin, C. Wang, F. Li, Z. Wang, H. Zhang, X.F. Li, X.C. Le, Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example-A review, *Anal. Chim. Acta.* 837 (2014) 1–15. doi:10.1016/j.aca.2014.04.055.
- [51] S. Pal, S. Paul, Conformational deviation of Thrombin binding G-quadruplex aptamer (TBA) in presence of divalent cation Sr^{2+} : A classical molecular dynamics simulation study, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 350–363. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.102.
- [52] V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, R. Eritja, A.M. Oliveira-Brett, Evaluation of the structure-activity relationship of thrombin with thrombin binding aptamers by voltammetry and atomic force microscopy, *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 159–166.

doi:10.1016/j.jelechem.2010.11.037.

- [53] S.V. Glinkina KA, Production of Thrombin Complexes with DNA Aptamers Containing G-Quadruplex and Different Duplexes, *J. Nephrol. Ther.* 04 (2014) 1–6. doi:10.4172/2161-0959.1000149.
- [54] A.J. Van Riesen, K.L. Fadock, P.S. Deore, A. Desoky, R.A. Manderville, S. Sowlati-Hashjin, S.D. Wetmore, Manipulation of a DNA aptamer-protein binding site through arylation of internal guanine residues, *Org. Biomol. Chem.* 16 (2018) 3831–3840. doi:10.1039/c8ob00704g.
- [55] L. Li, H. Zhao, Z. Chen, X. Mu, L. Guo, Aptamer-based electrochemical approach to the detection of thrombin by modification of gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 563–570. doi:10.1007/s00216-010-3922-2.
- [56] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. B.* 105 (2001) 4065–4067. doi:doi:10.1021/jp0107964.
- [57] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template, *Adv. Mater.* 13 (2001) 1389–1393. doi:10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F.
- [58] B. Nikoobakht, M. El-Sayed, Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed - Mediated Growth Method, *Chem. Mater.* 15 (2003) 1957–1962. doi:Doi 10.1021/Cm020732l.
- [59] N.D. Burrows, S. Harvey, F.A. Idesi, C.J. Murphy, Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments, *Langmuir.* 33 (2017) 1891–1907. doi:10.1021/acs.langmuir.6b03606.

-
- [60] N.R. Jana, Gram-scale synthesis of soluble, near-monodisperse gold nanorods and other anisotropic nanoparticles, *Small*. 1 (2005) 875–882. doi:10.1002/sml.200500014.
- [61] L. Vigderman, E.R. Zubarev, High yield synthesis of gold nanorods with longitudinal SPR peak greater than 1200 nm using hydroquinone as a reducing agent, *Chem. Mater.* 25 (2013) 1450-1457.
- [62] T.K. Sau, C.J. Murphy, M.L.H.C. Commun, A.C. Commun, Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution, *Langmuir*. (2004) 6414–6420.
- [63] G. Su, C. Yang, J.J. Zhu, Fabrication of gold nanorods with tunable longitudinal surface plasmon resonance peaks by reductive dopamine, *Langmuir*. 31 (2015) 817–823. doi:10.1021/la504041f.
- [64] L. Zhang, K. Xia, Z. Lu, G. Li, J. Chen, Y. Deng, S. Li, F. Zhou, N. He, Efficient and facile synthesis of gold nanorods with finely tunable plasmonic peaks from visible to near-IR range, *Chem. Mater.* 26 (2014) 1794–1798. doi:10.1021/cm403109k.
- [65] A. Gole, C.J. Murphy, Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size, *Chem. Mater.* 16 (2004) 3633–3640. doi:10.1021/cm0492336.
- [66] S.T. Jones, R.W. Taylor, R. Esteban, E.K. Abo-Hamed, P.H.H. Bomans, N.A.J.M. Sommerdijk, J. Aizpurua, J.J. Baumberg, O.A. Scherman, Gold nanorods with sub-nanometer separation using cucurbit[n]uril for SERS applications, *Small*. 10 (2014) 4298–4303. doi:10.1002/sml.201401063.
- [67] L. Scarabelli, A. Sánchez-Iglesias, J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán, A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 4270–4279. doi:10.1021/acs.jpcl.5b02123.
- [68] C.J. Murphy, L.B. Thompson, A.M. Alkilany, P.N. Sisco, S.P. Boulos, S.T.

-
- Sivapalan, J.A. Yang, D.J. Chernak, J. Huang, The many faces of gold nanorods, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 2867–2875. doi:10.1021/jz100992x.
- [69] N. Li, P. Zhao, D. Astruc, Anisotropic gold nanoparticles: Synthesis, properties, applications, and toxicity, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 1756–1789. doi:10.1002/anie.201300441.
- [70] M. Tebbe, C. Kuttner, M. Männel, A. Fery, M. Chanana, Colloidally Stable and Surfactant-Free Protein-Coated Gold Nanorods in Biological Media, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 5984–5991. doi:10.1021/acsami.5b00335.
- [71] K. Kozek, K. Kozek, W.-C. Wu, M. Sumeet, J. Tracy, Large-Scale Synthesis of Gold Nanorods through Continuous Secondary Growth, *Chem. Mater.* 25 (2013) 4537–4544. doi:10.1021/cm402277y.
- [72] D. Shajari, A. Bahari, P. Gill, M. Mohseni, Synthesis and tuning of gold nanorods with surface plasmon resonance, *Opt. Mater.* 64 (2017) 376–383. doi:10.1016/j.optmat.2017.01.004.
- [73] X. Huang, S. Neretina, M.A. El-Sayed, Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications, *Adv. Mater.* 21 (2009) 4880–4910. doi:10.1002/adma.200802789.
- [74] B. Nikoobakht, M.A. El-sayed, Evidence for Bilayer Assembly of Cationic Surfactants on the Surface of Gold Nanorods, *Langmuir.* 17 (2001) 6368–6374. doi:10.1021/la010530o.
- [75] T.K.S. and, C.J. Murphy, Self-Assembly Patterns Formed upon Solvent Evaporation of Aqueous Cetyltrimethylammonium Bromide-Coated Gold Nanoparticles of Various Shapes, *Langmuir.* 21 (2005) 2923–2929. doi:10.1021/LA047488S.
- [76] V. Ganesh, A. Muthurasu, Strategies for an enzyme immobilization on electrodes: Structural and electrochemical characterizations, *J. Phys. Conf.*

Ser. 358 (2012). doi:10.1088/1742-6596/358/1/012003.

- [77] J. Medina-Ramos, T.M. Alligrant, A. Clingenpeel, J.C. Alvarez, Comparing the hydrogen-bonding effect of brönsted bases in solution and when they are covalently bound to the surface of glassy carbon electrodes in the electrochemical behavior of hydroquinone, *J. Phys. Chem. C.* 116 (2012) 20447–20457. doi:10.1021/jp306542y.

Capítulo 6

Conclusiones generales

Capítulo 6

6.1. Conclusiones generales

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral se propuso como objetivo la síntesis de nanoestructuras de diversa naturaleza tales como mNPs@C, NiNWs y NRsAu, su caracterización y su posterior utilización en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos dirigidos a la detección y cuantificación de analitos de interés industrial como el etanol y de relevancia clínica como glucosa y α -trombina humana.

Se sintetizaron eficientemente mNPs@C, con una distribución homogénea de tamaño, empleando mecanoquímica, un método muy sencillo y económico. Mediante la incorporación por atrapamiento físico de las mNPs@C en una matriz de micropartículas de grafito, se obtuvo un electrodo compuesto mNPs@C/CPE. El mismo demostró tener excelentes propiedades electrocatalíticas hacia la reducción y la oxidación de peróxido de hidrógeno y un importante incremento de las corrientes asociadas a tales procesos. La incorporación de GOx a mNPs@C/CPE permitió el desarrollo de una plataforma para la cuantificación amperométrica de glucosa, GOx/mNPs@C/CPE. Este biosensor fue empleado de manera exitosa para la detección sensible y selectiva de glucosa en un amplio intervalo de concentraciones, con gran exactitud, incluso en presencia de compuestos fácilmente oxidables habitualmente presentes en fluidos biológicos, como ácido ascórbico y ácido úrico. Debido al excelente desempeño analítico fue posible determinar glucosa en suero sanguíneo humano de origen comercial. Los parámetros cinéticos del bioelectrodo demostraron que la actividad enzimática de GOx no se encuentra afectada, indicando que la matriz de carbono provee un microambiente apropiado para que la enzima mantenga su actividad biocatalítica.

El biosensor demostró ser operativamente estable a largo plazo, manteniendo la sensibilidad en un valor del 100 % luego de transcurridos 100 días desde su preparación.

Con respecto a la obtención de nanomateriales unidimensionales, se sintetizaron NiNWs por electrodeposición en membranas comerciales de óxido de aluminio, de manera simple y reproducible, con una estructura altamente cristalina. A partir de la incorporación de los NiNWs en una matriz de carbono se obtuvo un sensor no enzimático (CPE/NiNWs) para la detección amperométrica de etanol en medio alcalino. CPE/NiNWs demostró tener un desempeño destacado con una respuesta rápida y bien definida, gran estabilidad operacional a corto plazo y largo, permitiendo el uso continuo de la misma superficie por aproximadamente una hora y sin cambios apreciables en los valores de sensibilidad al cabo de 60 días. Además, fue posible determinar la concentración de etanol en bebidas destiladas, con una excelente correlación con el valor informado por el fabricante.

Por otra parte se sintetizaron NRsAu, de forma y tamaño altamente homogéneos, a través de un método químico mediado por semillas. Se diseñó un aptasensor para la cuantificación de α -trombina humana mediante la inmovilización de los NRsAu sobre una superficie de oro derivatizada con BPDT, obteniéndose la plataforma AuE/BPDT/NRsAu, la cual fue utilizada como punto de partida para el anclaje covalente del aptámero anti- α -trombina humana (ApT). Se demostró que el ApT fue inmovilizado eficientemente manteniendo las propiedades de reconocimiento hacia α -trombina humana. Se logró la cuantificación sensible y selectiva de α -trombina humana mediante experimentos impedimétricos, obteniéndose un límite de detección en el orden de nanomoles por litro, valor comparable con los reportados por otros autores.