

Tesis Doctoral

# “Evaluación de nanoestructuras para sensores inmunológicos”

---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Instituto Superior de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología  
Tucumán, Argentina.

TESISTA:

Ing. Biom. Ricardo Matías Trujillo

DIRECTORA:

Dra. Rossana Elena Madrid

DIRECTOR ASOCIADO:

Dr. David Mario Comedi

2018

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción General</b>	<b>16</b>
1.1. <i>Diabetes mellitus</i> . . . . .	17
1.2. Citrus . . . . .	19
1.2.1. Frutos . . . . .	20
1.3. Relevancia en la actividad económica . . . . .	21
1.3.1. El citrus en el mercado internacional . . . . .	21
1.3.2. El citrus en el mercado argentino . . . . .	22
1.3.2.1. Tucumán . . . . .	22
1.4. Huang long bin (HLB) . . . . .	26
1.5. Diagnósticos actuales de HLB . . . . .	29
1.5.1. Técnicas de microscopía para detectar HLB . . . . .	29
1.5.2. Técnicas moleculares para detectar HLB . . . . .	29
1.5.3. Técnicas espectroscópicas para detectar HLB . . . . .	30
1.5.4. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) para detectar HLB . . . . .	30
1.5.5. Dispositivos de flujo lateral para detectar HLB . . . . .	30
1.6. Algunos métodos para el control del HLB . . . . .	31
1.6.1. Nutricionales . . . . .	31
1.6.2. Control del vector . . . . .	31
1.6.3. Control químico . . . . .	32
1.6.4. Control con variedades resistentes . . . . .	32
1.7. Compuestos polifenólicos . . . . .	32
1.7.1. Flavonoides . . . . .	32
1.7.2. Actividad Biológica . . . . .	33
<b>2. Sensores y Biosensores</b>	<b>35</b>
2.1. Introducción . . . . .	36

2.2.	Nanoestructuras para sensado de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	36
2.2.1.	Hexacianoferrato metálicos . . . . .	38
2.2.2.	Otros Hexacianoferrato metálicos . . . . .	41
2.2.3.	Nanoestructuras metálicas . . . . .	41
2.2.4.	Nanoestructuras de óxidos metálicos . . . . .	43
2.2.5.	Nanoestructuras mixtas . . . . .	45
2.2.6.	Biomoléculas . . . . .	47
2.3.	Nanoestructuras para sensores de bioafinidad . . . . .	52
2.3.1.	Nanoestructuras metálicas . . . . .	56
2.3.2.	Nanoestructuras de óxidos metálicos . . . . .	58
2.4.	Conclusiones . . . . .	62
<b>3.</b>	<b>Biosensor de Glucosa basado en nanoestructuras de ZnO</b>	<b>64</b>
3.1.	Introducción . . . . .	65
3.2.	Materiales y Método . . . . .	66
3.2.1.	Nanopartículas . . . . .	66
3.2.2.	Preparación del biosensor . . . . .	67
3.2.2.1.	Inmovilización de la enzima . . . . .	67
3.3.	Resultados y Discusión . . . . .	68
3.4.	Conclusiones . . . . .	71
<b>4.</b>	<b>Films delgados de ZnO</b>	<b>73</b>
4.1.	Introducción . . . . .	74
4.2.	Materiales y Método . . . . .	75
4.2.1.	Reactivos . . . . .	75
4.2.2.	Crecimiento de los TFs . . . . .	75
4.2.3.	Mediciones impedancimétricas . . . . .	77
4.2.4.	Modelos circuitales . . . . .	78
4.3.	Resultados y discusión . . . . .	79
4.3.1.	Variabilidad de los TFs debida a la fabricación . . . . .	79
4.3.2.	Cambios en la respuesta de impedancia por la luz ambiente	80
4.3.3.	Estudio de la influencia de la temperatura sobre los TFs .	81
4.4.	Conclusiones . . . . .	82
<b>5.</b>	<b>Biosensor de afinidad</b>	<b>83</b>
5.1.	Introducción . . . . .	84
5.2.	Materiales y métodos . . . . .	85
5.2.1.	Anticuerpo y antígeno . . . . .	86

5.2.2.	Análisis Dot-Blot . . . . .	86
5.2.3.	Preparación del electrodo . . . . .	86
5.2.3.1.	Monocapas autoensambladas con ZnO NPs . . . . .	86
5.2.3.2.	Experimentos electroquímicos . . . . .	88
5.3.	Resultados y Discusión . . . . .	88
5.3.1.	Espectroscopía de fotones de rayos X . . . . .	88
5.3.2.	Ángulo de contacto . . . . .	89
5.3.3.	Estabilidad de las SAMs . . . . .	90
5.3.4.	Caracterización electroquímica . . . . .	92
5.3.4.1.	Electrodo con SAM 2 . . . . .	92
5.3.4.2.	Electrodo con SAMP 1 . . . . .	93
5.3.4.3.	Detección impedancimétrica del NPTII . . . . .	95
5.4.	Conclusiones . . . . .	96
<b>6.</b>	<b>Nanopartículas de Prussian Blue para sensado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>98</b>
6.1.	Introducción . . . . .	99
6.2.	Materiales y Métodos . . . . .	99
6.2.1.	Síntesis de las nanopartículas . . . . .	99
6.2.2.	Equipo y celda electroquímica . . . . .	99
6.2.3.	Preparado del electrodo . . . . .	100
6.2.4.	Mediciones electroquímicas . . . . .	100
6.2.5.	SEM . . . . .	101
6.2.6.	Espectrofotometría . . . . .	101
6.3.	Resultados . . . . .	101
6.3.1.	Caracterización . . . . .	101
6.3.2.	Voltametría cíclica . . . . .	103
6.3.3.	Impedancia . . . . .	106
6.3.4.	Amperometría . . . . .	107
6.3.5.	Medición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con impedancia . . . . .	109
6.3.6.	Comportamiento dinámico . . . . .	111
6.3.7.	Interferentes . . . . .	113
6.4.	Discusión . . . . .	113
6.5.	Conclusiones . . . . .	115
<b>7.</b>	<b>Films delgados de Prussian Blue</b>	<b>116</b>
7.1.	Introducción . . . . .	117
7.1.1.	Materiales y Métodos . . . . .	117
7.1.1.1.	Reactivos . . . . .	117

7.1.1.2.	Descripción del Electrodo . . . . .	118
7.1.1.3.	Mediciones electroquímicas . . . . .	118
7.1.1.3.1.	Cálculos de I en estado estacionario . . . . .	118
7.1.1.3.2.	Electrodeposición potencioestática . . . . .	118
7.1.1.3.3.	Electrodeposición potenciodinámica . . . . .	119
7.1.1.3.4.	Respuesta amperométrica . . . . .	119
7.1.2.	Resultados . . . . .	119
7.1.2.1.	Voltametría cíclica . . . . .	119
7.1.2.2.	Amperometría . . . . .	119
7.1.2.3.	Corriente en Estado Estacional ( $i_{ss}$ ) . . . . .	122
7.1.3.	Discusión . . . . .	122
7.1.4.	Conclusiones . . . . .	123
<b>8.</b>	<b>Evaluación del elemento de biorreconomiento para detección de HLB</b>	<b>125</b>
8.1.	Introducción . . . . .	126
8.2.	Materiales y Métodos . . . . .	127
8.2.1.	Material vegetal . . . . .	127
8.2.2.	Efectos sobre la actividad de la enzima HRP. . . . .	127
8.2.3.	Determinación de Fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu . . . . .	128
8.2.4.	Inhibición de la HRP por los flavonoides puros . . . . .	129
8.2.5.	Inhibición enzimática en presencia de extractos vegetales . . . . .	129
8.3.	Resultados . . . . .	130
8.3.1.	Respuesta del biosensor a la infección con <i>Xanthomona Cam-petris</i> . . . . .	134
8.3.2.	Respuesta del biosensor a la infección con HLB . . . . .	135
8.4.	Evaluación del proceso de extracción en la respuesta del biosensor . . . . .	136
8.5.	Discusión . . . . .	138
8.6.	Conclusiones . . . . .	139
<b>9.</b>	<b>Inmovilización de la enzima para el biosensor de HLB</b>	<b>141</b>
9.1.	Introducción . . . . .	142
9.2.	Materiales y métodos . . . . .	144
9.2.1.	Reactivos y equipamiento . . . . .	144
9.2.2.	Inmovilización con quitosán . . . . .	145
9.2.2.1.	Preparación de la solución de quitosán con nanopartículas . . . . .	145

9.2.2.2.	Inmovilización de HRP en soluciones de chitosan con nanopartículas de TiO <sub>2</sub> . . . . .	145
9.2.2.3.	Inmovilización de HRP con chitosan, en PET modificado mecánicamente . . . . .	145
9.2.2.4.	Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #1 sobre PET modificado mecánicamente . . . . .	146
9.2.2.5.	Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #2 sobre PET modificado mecánicamente . . . . .	146
9.2.2.6.	Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #3 sobre PET modificado mecánicamente . . . . .	146
9.2.3.	Determinación de la cantidad de enzima activa inmovilizada . . . . .	147
9.2.3.1.	Determinación de la relación enzima - velocidad máxima de reacción . . . . .	147
9.2.3.2.	Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada . . . . .	147
9.2.4.	Prueba de inhibición con quercetin . . . . .	148
9.2.5.	Determinación de la Ic <sub>50</sub> . . . . .	148
9.2.6.	Ensayo con muestras reales . . . . .	149
9.3.	Resultados . . . . .	150
9.3.1.	Inmovilización con chitosan . . . . .	150
9.3.1.1.	Inmovilización de HRP en PET modificado mecánicamente, con solución de Chitosan y nanopartículas de TiO <sub>2</sub> . . . . .	150
9.3.2.	Determinación de la cantidad de enzima activa inmovilizada . . . . .	150
9.3.3.	Prueba de inhibición con quercetin . . . . .	152
9.3.4.	Determinación de la Ic <sub>50</sub> . . . . .	152
9.3.5.	Ensayo con muestras reales . . . . .	153
9.4.	Conclusiones . . . . .	154
<b>10.</b>	<b>Conclusiones generales y perspectivas futuras</b>	<b>155</b>
<b>A.</b>	<b>Obtención de antígeno NPTII</b>	<b>160</b>

<b>Obtención del antígeno NPTII</b>	<b>160</b>
A.1. Purificación del NPTII . . . . .	160
A.2. Dot-blot . . . . .	161
A.2.1. Resultado del Dot-blot . . . . .	161
<b>B. Algunas Enfermedades del Citrus</b>	<b>163</b>
<b>Algunas Enfermedades del Citrus</b>	<b>163</b>
B.1. Fúngicas . . . . .	163
B.1.1. <i>Sarna</i> . . . . .	163
B.1.2. <i>Melanosis</i> . . . . .	165
B.1.3. <i>Mancha Grasienda</i> . . . . .	166
B.1.4. <i>Gomosis de los citrus y Podredumbre Parda</i> . . . . .	167
B.2. Virales . . . . .	168
B.2.1. <i>Psorosis</i> . . . . .	168
B.2.2. <i>Tristeza</i> . . . . .	169
B.2.3. <i>Exocortis</i> . . . . .	170
B.3. Bacterianas . . . . .	171
B.3.1. <i>Cancrosis</i> . . . . .	171

# Resumen

Esta tesis posee información confidencial, factible de patentamiento, por lo tanto no será publicada hasta tanto se realice la protección de propiedad intelectual correspondiente.

En este trabajo se estudiaron diferentes nanoestructuras para diferentes aplicaciones de biosensado. Se estudiaron también diferentes formas de funcionalización de los electrodos. Si bien en un principio la aplicación principal de estudio fueron los biosensores inmunológicos, las aplicaciones que se exploraron fueron mucho más amplias, logrando desarrollos muy interesantes y prometedores. Particularmente, el desarrollo de un biosensor para la detección de una enfermedad muy grave en plantas cítricas, el HLB, permitió lograr un dispositivo que se encuentra en fase de patentamiento y prueba de factibilidad en campo.

El primer material estudiado fue el ZnO, en diferentes formas nanoestructuradas, particularmente nanopartículas (NPs), nanohilos (NWs) y thin films (TFs). Para esto se desarrolló un biosensor de glucosa, el cual permite la cuantificación de concentraciones muy bajas de glucosa. El mismo presentó mejor sensibilidad que los biosensores de glucosa de primera generación, debido al empleo de nanoestructuras de óxido de zinc (NPs y NWs) en la superficie del biosensor de pasta de carbón, a diferencia de la inmovilización en volumen comúnmente empleada en este tipo de sensores. Con esta metodología de inmovilización se abre la posibilidad de biosensores descartables, sensibles y de bajo costo. La cronimpedanciometría fue la técnica utilizada para la determinación de la glucosa. Respecto de los TFs, se investigó el comportamiento del ZnO depositado como un film delgado nanoestructurado (TF) sobre un sustrato aislante eléctricamente ( $\text{AlO}_3$  o Zafiro). Se estudiaron las propiedades de transporte de este nanomaterial mediante la espectroscopia de impedancia. Estas mediciones se realizaron analizando diferentes situaciones, como ser agregados de soluciones buffer y de glucosa en distintas concentraciones, con y sin enzima inmovilizada.



Otra nanoestructura estudiada fueron las NPs de Titanio, con las cuales se desarrolló un biosensor para la detección del HLB. El mismo consiste en un biosensor de inhibición, en el cual, las NPs de Ti permiten la inmovilización de una cantidad adecuada de enzima en el biosensor para hacerlo lo suficientemente sensible. Estudiando NPs de Prussian Blue, se desarrolló también un sensor electroquímico para el mismo fin. Este sensor permite la medición de muy bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El HuangLongBing (HLB) es la enfermedad más destructiva de los cítricos en el mundo debido a la severidad de los síntomas. Hasta el momento no existe un tratamiento curativo, solo se adoptan medidas para evitar su expansión. Debido a que la enfermedad presenta un largo periodo de latencia presintomático (mayor a 6 meses) durante el cual se sigue produciendo la transmisión, la principal medida de lucha es un riguroso monitoreo de plantas y vectores, mediante métodos de diagnóstico rápidos y sensibles a fin de responder inmediatamente ante la aparición del patógeno. Los métodos actuales para detectar al patógeno incluyen microscopía, serología y técnicas de biología molecular basadas en hibridización ADN-ADN y en reacciones de amplificación de secuencias de ADN específicas del patógeno, como PCR y LAMP. Por lo expuesto, y empleando las nanoestructuras estudiadas, se buscó desarrollar un sistema de diagnóstico en base a nanotecnología para detectar al mismo tiempo diferentes “analitos marcadores” de la presencia de la bacteria en la planta, y en especial en sus primeros estadios, de tal forma que permita hacer una detección rápida, sensible, específica, de bajo costo y que pueda ser realizada en campo, sin necesidad de llevar muestras al laboratorio. Se evaluaron diferentes métodos de inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano en diferentes sustratos. Se estudió como soporte polimérico al Tereftalato de polietileno (PET) y las formas de modificarlo para lograr la mejor funcionalización. Los agentes evaluados para la inmovilización de la enzima fueron el Polyethylenimine (PEI), Chitosan, Glutaraldehido y dos tipos de nanopartículas (de ZnO y óxido de titanio). El biosensor evalúa la actividad de la enzima peroxidasa cuando se colocan extractos de hojas de plantas de citrus en los cuales se simulaban condiciones de enfermedad.

El tercer sensor que se desarrolló, fue un sensor de  $H_2O_2$ , el cual es un importante analito presente en reacciones enzimáticas, industria y medicina. Se investigó el empleo de un compuesto reactivo al  $H_2O_2$ , el Prussian Blue (PB), el cual fue nanoestructurado de dos maneras, en forma de film (PBTF) y de nanopartículas (PBNPs). En el caso del PBTF, se electrodepositó usando dos técnicas diferentes, electrostática y electrodinámicamente sobre microelectrodos de

platino (ECC MDEA 5037-Pt; ABTECH Scientific, Inc.) y se estudiaron sus respuestas electroquímicas. El método potencioestático mostró una sensibilidad 200 veces mayor que el potenciódinámico. Las PBNPs y su capacidad electrocatalítica sobre el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , fue evaluada haciendo uso de dos electrodos, uno de oro y otro con óxido de iridio electrodepositado (EIROF) sobre oro. Con la técnica de síntesis de PBNPs y funcionalización de los electrodos se logró medir  $\text{H}_2\text{O}_2$  de manera estable en medios básicos a 0V, presentando la mejor respuesta el electrodo de nanoestructuras combinadas EIROF-PBNPs. Estos mismos electrodos se emplearon para evaluar la respuesta electroquímica frente a extractos etanólicos de hojas de plantas de citrus.

Por último, para el estudio de los diferentes métodos de funcionalización de los sustratos para la inmovilización adecuada de los bioreceptores y nanoestructuras, y considerando que el “drop-casting” es una técnica sencilla pero que no permite un control preciso sobre el diseño de los biosensores, se estudió por último, la inmovilización de nanopartículas de ZnO sobre monocapas autoensambladas (SAMs). La inmovilización estable y homogénea de las nanoestructuras sobre sustratos sólidos es un factor clave para el desarrollo de los sensores. La estabilidad de las nanoestructuras se evaluó usando X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Contact Angle (CA) y Microscopía electrónica de Barrido (SEM). Por último, la funcionalización con anticuerpos y la detección del antígeno específico se realizó mediante diferentes técnicas electroquímicas.

## Publicaciones y presentaciones a congresos

Parte del trabajo descrito en esta tesis está en proceso de patentamiento. Además, produjo las siguientes publicaciones y/o presentaciones a congresos:

Comunicaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales:

- Mejora de la sensibilidad de un biosensor enzimático de glucosa mediante el uso de nanopartículas de ZnO. Resultados preliminares. Autores: R. M. Trujillo, L.D. Sappia, M. Tirado, D. Comedi, R. E. Madrid. Proceedings del XX Congreso Argentino de Bioingeniería, realizado los días 28, 29 y 30 de Octubre de 2015, San Nicolás, Buenos Aires. ISBN 978-950-42-0166-3.
- R M Trujillo, C Grellet, M L Tereschuk, R E Madrid y P Filippone.. “Evaluación de la cinética enzimática de peroxidasa como elemento de biorreconocimiento para un biosensor de fenólicos”. Proceedings del XX Congreso

Argentino de Bioingeniería, realizado los días 28, 29 y 30 de Octubre de 2015, San Nicolás, Buenos Aires. ISBN 978-950-42-0166-3.

- Trujillo R.M., Sappia, LD, Lorite I, Madrid RE, Tirado M, Comedi DM, Esquinazi P. Evaluation of growth temperature influence on the transport properties of ZnO thin films by impedance spectroscopy. Preliminary Results. International Workshop of Impedance Spectroscopy 2016. September 26-28 2016, Chemnitz, Germany.
- R.M. Trujillo, M.L. Zamora, C. Dore, F. Ashur, A. Cattani-Scholz, R.E. Madrid. Multi-nanostructured auto-regenerative sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantification with enhanced sensitivity at zero potential. 17th edition of Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2016), 5-9 septiembre 2016, Fribourg (Suiza).
- Martín Lucas Zamora; Ricardo Matías Trujillo; Fernando Ashur; Rossana Elena Madrid, "Multi-nanostructured and auto-regenerative sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantification using chronoimpedance as transduction method", II International Seminar of Industrial Innovation in Electrochemistry, Curitiba, 2016.

Publicaciones en revistas científicas publicadas y en proceso de redacción:

- Zamora L. M., Trujillo, R.M. y Felice C.J. Espectroscopía 3D de impedancia no lineal. Revista IEEE América Latina Volume: 12, Issue: 5, Aug. 2014
- Nanostructured ZnO films: A study of molecular influence on transport properties by impedance spectroscopy. Autores: Luciano D. Sappia, Matías R. Trujillo, Israel Lorite, Rossana E. Madrid, Monica Tirado, David Comedi, Pablo Esquinazi. Journal of Materials Science and Engineering B 200 (2015) 124–131; United States.
- M.L. Zamora, R.M. Trujillo, C. Kotanen, R.E. Madrid, A. Guiseppi-Elie. Interfacial Engineering for Enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Electrode Performance. Enviado a Sensors and Actuators B para su revisión.
- Domínguez, J.M.; Zamora, M.L.; Trujillo, R.M.; Goy, C.B.; Sánchez, M.A.; Madrid, R.E. Potentiometric textile-based pH sensor. Sensors and Actuators B 260 (2018) 601–608. DOI: 10.1016/j.snb.2018.01.002

- Trujillo R.M., Sappia, LD, Lorite I, Madrid RE, Tirado M, Comedi DM, Esquinazi P. Evaluation of growth temperature influence on the transport properties of ZnO thin films by impedance spectroscopy. En preparación.
- R M Trujillo, C Grellet, F. Ashur, M L Tereschuk, R E Madrid y P Filippone. "Polymeric-based Biosensor for Polyphenols". En preparación.
- R.M. Trujillo, C. Dore, L. Castro, R. E. Madrid, A. Cattani-Scholz. "Covalent binding of designed ZnO nanostructures on Gold for biosensing applications". En preparación.
- R.M. Trujillo, M.L. Zamora, C. Dore, F. Ashur, A. Cattani-Scholz, R.E. Madrid. "Multi-nanostructured auto-regenerative sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantification with enhanced sensitivity at zero potential". Listo para ser enviado, a la espera del análisis de patentabilidad.
- R.M. Trujillo, M.L. Zamora and R.E. Madrid. Nanostructures in Hydrogen Peroxide Sensing. Review. En preparación.
- R.M. Trujillo, M.L. Zamora and R.E. Madrid. Affinity nanostructured biosensors. Review. En preparación.

Transferencias tecnológicas en preparación, o enviadas y en revision:

- R.M. Trujillo, M.L. Zamora, C. Dore, F. Ashur, A. Cattani-Scholz, R.E. Madrid. Sensor nanoestructurado para cuantificar peróxido de hidrógeno con alta selectividad y procedimiento de uso. Reporte de invento enviado al CONICET bajo análisis.
- Trujillo, R.M., Grellet Bournonville, C.F., Madrid, R.E., Filippone, M.P., Cattani-Scholz, A., Felice, C.J. and Castagnaro, A.P. Biosensor para la detección temprana de HLB en citrus. Inventores: Patente en conjunto con la Universidad Técnica de Munich bajo análisis previo.

Cabe destacar que el desarrollo de la tesis doctoral ha sido posible gracias al trabajo interdisciplinario y la colaboración de los siguientes grupos de investigación:

- The NanoProject, Laboratorio de Nanomateriales y Propiedades dieléctricas de la Materia, Laboratorio de Física del Sólido-Departamento de Física, FACET-UNT.

- Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino y Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC).
- Cátedra de Química Orgánica, FACET-UNT
- Division of Superconductivity and Magnetism, Institute for Experimental Physics II, University of Leipzig.
- Walter Schottky Institut and Physics Department, Technische Universität München

## Esquema de la tesis

En este manuscrito se presenta en primer lugar el marco teórico para las aplicaciones de biosensado y, posteriormente en capítulos separados cada una de estas aplicaciones.

A continuación se describe lo desarrollado en cada capítulo en particular:

- En el **Capítulo 1** se hace una breve descripción de ambas problemáticas, la diabetes mellitus y el Huang Long Bing. También se exponen algunos de los los métodos actuales de detección.
- En el **Capítulo 2** En este capítulo se presenta una revisión bibliográfica sobre diferentes nanoestructuras, conceptos de diseño, métodos de transducción y rendimiento de detección de nanoestructuras para el desarrollo de sensores de  $H_2O_2$  y biosensores inmonológicos. Esta revisión permitió analizar y evaluar las técnicas de fabricación y transducción más adecuadas para ser empleadas en esta tesis.
- El **Capítulo 3** describe el desarrollo de un biosensor de glucosa basado en grafito, nanopartículas de ZnO y Glucosa Oxidasa como elemento de bio-reconocimiento. La transducción de la señal se hizo electroquímicamente. En este estudio se comparó además la respuesta del biosensor fabricado con nanopartículas y nanohilos de ZnO.
- En el **Capítulo 4** se estudió el comportamiento de films de espesor nanométrico de ZnO como un nuevo método de transducción para sensores de glucosa. La configuración de los contactos eléctricos fue bipolar, los analitos se depositaron en la superficie del film y la respuesta se obtuvo usando impedancia electroquímica.

- Este capítulo forma parte de la tesis de finalización de la carrera de Ing. Biomédica de Luis Eduardo Castro, dicho trabajo fue planificado y dirigido por el autor del presente escrito. Continuando con las nanoestructuras de ZnO, en el **Capítulo 5** se planteó la inmovilización de anticuerpos sobre nanopartículas de ZnO. Primero se modificaron electrodos de Silicio con superficie de oro usando monocapas autoensambladas (SAMs) y sobre estas se enlazaron covalentemente las nanopartículas. Los diversos pasos de la modificación del electrodo y la performance del inmunosensor se estudiaron por métodos físicos y químicos.
- En el **Capítulo 6** se trabajó con nanopartículas de origen organo-metálico, denominadas Prussian Blue (PBNPs). Se desarrolló un sensor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aprovechando la habilidad de las PBNPs para catalizar dicho compuesto a sobrepotenciales cercanos a 0V vs. el electrodo de referencia. Los análisis electroquímicos mostraron una excelente respuesta a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, el uso de las PBNPs permitió prescindir de métodos de inmovilización como por ejemplo el uso de Nafion para evitar el filtrado del elemento de transducción al medio.
- Otra manera de hacer uso del Prussian Blue fue evaluado en el **Capítulo 7**. Aquí se depositó selectivamente un film nanoestructurado de Prussian Blue sobre electrodos denominados *Celda-en-un-chip* para aplicaciones biomédicas. En este trabajo se evaluaron dos métodos de electrodeposición y fueron caracterizados por medio de voltametría cíclica y analizando cambios en la corriente de estado estacionario.
- Con el objetivo de desarrollar un biosensor para la detección temprana y asintomática del HLB, en el **Capítulo 8** se evaluó el comportamiento de la Peroxidasa de Rábano (HRP) cuando se le agregaron distintos extractos de hojas de citrus. Para ello se estudió la cinética enzimática haciendo uso de un método colorimétrico.
- El **Capítulo 9** es parte de la tesis de grado del Ing. Biomédico Fernando Ashur, la cual fue planificada y dirigida por el autor del presente trabajo. Aquí se estudiaron distintos soportes y nanoestructuras para la inmovilización de la HRP con el fin de desarrollar un biosensor con un formato de tira reactiva colorimétrica. Tanto la eficiencia de la inmovilización como el comportamiento de la tira reactiva frente a los agregados de flavonoides puros y extractos reales se evaluaron colorimétricamente.

- Por último, en el **Capítulo 10** se muestran las conclusiones finales y perspectivas futuras.

# Capítulo 1

## Introducción General

*El futuro de la humanidad y de la vida en la tierra es muy incierto. Estamos en peligro de destruirnos a nosotros mismos, por nuestra codicia y estupidez.*

Stephen Hawking



## 1.1. *Diabetes mellitus*

En el 2014 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) estimó en 387 millones el número de personas afectadas por esta enfermedad. Un paciente que padece diabetes se realiza controles utilizando tiras reactivas, en promedio, unas 5 veces al día, suponiendo una demanda de 706.000 millones de tiras por año.

Si bien el costo de la tira reactiva depende del país, se podría tomar un valor promedio de \$400 las 25 tiras, o aproximadamente \$16 (1USD) por tira reactiva, indicando que actualmente la comercialización de tiras reactivas representa un movimiento de 765 millones de dólares en el mundo. Para el año 2035 la IDF prevé un incremento de 205 millones de personas con diabetes en el mundo. Esto conlleva a la necesidad de satisfacer la demanda, propiciando condiciones óptimas para el desarrollo de nuevos biosensores, con características que permitan al paciente realizar

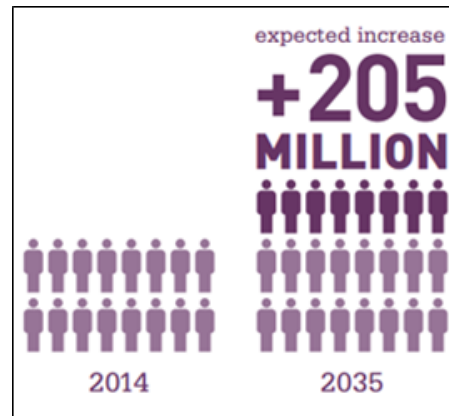


Figura 1.1: Proyección sobre la cantidad de diabéticos en el mundo para 2035 según la IDF.

mediciones rápidas y precisas de su nivel de glucosa. En este contexto, hay una demanda creciente y sostenida de tiras reactivas, además de los diferentes insumos que utilizan los sistemas que están actualmente en el mercado (lancetas, diapunsos, etc.). En Argentina, según datos de la Comisión Nacional de Diabetes (CONADI) del Ministerio de Salud el 8 % de la población tiene diabetes, es decir 3.040.000 personas de las cuales el 10 % tiene Diabetes Tipo I (304.000 personas) y el otro 90 % tiene Diabetes Tipo II (2.736.000 personas). Por lo establecido en la Ley N° 26.914 y posterior modificación Ley N° 23.753: *Artículo 1* Será Autoridad de Aplicación de la presente Ley el Ministerio de Salud de la Nación, que dispondrá a través de las áreas pertinentes el dictado de las medidas necesarias para la divulgación de la problemática derivada de la enfermedad diabética y sus complicaciones, de acuerdo a los conocimientos científicamente aceptados, tendiente al reconocimiento temprano de la misma, su tratamiento y adecuado control. Llevará su control estadístico, prestará colaboración científica y técnica a las autoridades sanitarias de todo el país, a fin de coordinar la planificación de acciones. Garantizará la producción, distribución y dispensación de los medicamentos y reactivos de diagnóstico para autocontrol a todos los pacientes con diabetes, con el objeto de asegurarles el acceso a una terapia

adecuada de acuerdo a los conocimientos científicos, tecnológicos y farmacológicos aprobados, así como su control evolutivo. *Artículo 5* La Autoridad de Aplicación de la presente ley establecerá Normas de Provisión de Medicamentos e Insumos, las que deberán ser revisadas y actualizadas como mínimo cada 2 (dos) años, a fin de poder incluir en la cobertura los avances farmacológicos y tecnológicos, que resulten de aplicación en la terapia de la diabetes y promuevan una mejora en la calidad de vida de los pacientes diabéticos. La cobertura de los medicamentos y reactivos de diagnóstico para autocontrol de los pacientes con diabetes, será del 100 % y en las cantidades necesarias según prescripción médica.

Es decir, por Ley el Estado Argentino debe disponer de un mínimo de 400 tiras reactivas por paciente al año, que significa una erogación por parte del erario nacional de alrededor de 1216 millones de pesos anuales como mínimo (ca. 1000 millones de dólares). Además, el costo de las tiras reactivas por paciente representa el 50 % de la cobertura total a un paciente diabético (datos obtenidos del Ministerio de Salud de Misiones y Córdoba), siendo el gasto médico sólo un 5 % del total.

La prevalencia de la diabetes aumenta constantemente y la Organización Mundial de la Salud proyecta que el número de personas con diabetes se duplicará entre el 2000 y 2030 (Wild, 2004). Según un informe de Naciones Unidas, donde se detallan las 20 causas principales de muerte, la diabetes mellitus se ubica en el puesto 12 en el año 2004, y se estima que pasará al puesto 7 para el 2030 (WHO, 2008). En la República Argentina no existen censos recientes que provean datos para evaluar el estado sanitario, los costos de atención al diabético, y, más aún cuantificar el impacto de campañas de detección temprana. La cuantificación de la prevalencia de la diabetes es importante para permitir una correcta planificación y distribución de recursos. Williams (Williams, 2002) indica que el costo de la atención de personas con diabetes es 3-5 veces mayor que el de quienes no la padecen, y este costo aumenta en función del desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas de la enfermedad [1]

Los sensores químicos tienen hoy en día un renovado interés debido a las urgentes necesidades actuales de disponer de más y mejor información analítica en condiciones no convencionales. En efecto, unas veces en complementariedad, otras en oposición al diseño o concepto que representan los grandes equipos analíticos (de elevado coste, de manipulación especializada y confinados en recintos acondicionados), los sensores químicos representan una nueva clase de instrumentación analítica, caracterizada por dimensiones pequeñas, bajo coste,

utilización amigable y generación de información (idealmente) en tiempo real.

Un sensor químico se puede definir como un dispositivo que transforma información química en una señal analítica útil. Consta, principalmente, de dos partes: un receptor, que proporciona el reconocimiento de la sustancia a analizar, y un transductor, que convierte la señal química obtenida de la sustancia en una señal medible por un instrumento. Si el elemento de reconocimiento es un reactivo biológico, se trata de un biosensor. Por otro lado, durante los últimos años, científicos de todo el mundo han puesto su atención en la nanociencia, es decir el estudio de la materia estructurada en tamaños de 1 nm a algunos cientos de nm, desarrollando diferentes métodos para dividir y manipular la materia a escala nanoscópica. Dentro de la diversidad de elementos factibles de ser nanoestructurados aparece el ZnO, un semiconductor II-VI de estructura cristalina hexagonal wurzita con propiedades interesantes que resultan prometedoras para el desarrollo y mejoramiento de numerosos dispositivos electrónicos, fotónicos, optoelectrónicos, y particularmente biosensores, puesto que no sólo es un material biocompatible con alto punto isoeléctrico y que sirve como soporte para diferentes enzimas, sino que además, cambios en la morfología y/o tamaño de las nanoestructuras de ZnO, como así también alteraciones en el contorno superficial afectan drásticamente sus propiedades, dando lugar a nuevas variables de control ausentes en la escala macroscópica. Además, a diferencia de otros compuestos, la tecnología y materias primas para el crecimiento de ZnO son mucho más económicas, y puede fabricarse a relativamente bajas temperaturas sobre sustratos de bajo costo (como por ejemplo, vidrio). Trabajar en la nanoescala implica no sólo miniaturizar, sino además un gran aumento de la relación superficie/volumen permitiendo maximizar la sensibilidad, que para el caso de biosensores es un parámetro muy importante.

## 1.2. Citrus

El género *Citrus*, comúnmente denominado cítrico, abarca numerosas especies de arbustos y arbolillos perennes de la familia de las rutáceas. Diversos estudios ubican su origen en el sudoeste asiático, hace cerca de 7 millones de años.

Todos los miembros de este género poseen la rara combinación de compatibilidad sexual interespecífica y alta tendencia a la mutación, lo que los hace particularmente aptos para la hibridación. Así, de sólo cuatro ancestros comunes: *C. medica* (citrón o cidra), *C. micrantha*, *C. máxima* (pomelo chino) y *C.*

reticulata (mandarina); han derivado todas las especies y variedades de cítricos conocidas hasta la actualidad. Esta particularidad, a su vez, ha generado cierta confusión en la clasificación taxonómica de algunas especies. De las miles de variedades, sin embargo, solo alrededor de una docena ha logrado un difundido estatus comercial.

Los citrus son naturalmente árboles de clima tropical o subtropical donde los cambios de estación son poco significantes. Poseen escasa resistencia a bajas temperaturas: las flores y frutos mueren en temperaturas de  $-3^{\circ}\text{C}$  mientras que las ramas y tallos generalmente mueren tras poco tiempo a temperaturas de entre  $-3^{\circ}\text{C}$  y  $-7^{\circ}\text{C}$ , dependiendo del grado de aclimatación, la especie y edad del espécimen. La producción de plantas cítricas se hace por propagación vegetativa, con la técnica del injerto. En gran medida, las características de la planta resultante dependerán del porta-injertos usado en su obtención. Por ejemplo, el uso de *Poncirus trifoliata*, de hoja caduca, ayuda a las plantas obtenidas con el mismo a reducir su metabolismo durante el invierno y soportar mejor las bajas temperaturas.

El citrus ilustra como ningún otro cultivo, la influencia del clima en la calidad de la fruta ya que tanto la calidad interna como externa de la misma difieren en gran medida entre las cultivadas en climas húmedos subtropicales y las de clima mediterráneo. Temperatura y humedad son los principales factores determinantes de la calidad del citrus. Algunas de las diferencias que pueden notarse son:

- Mayor contenido de jugo en las frutas de clima subtropical
- Mayor contenido ácido y menor contenido de azúcar en las frutas de clima mediterráneo debido a temperaturas más cálidas durante la maduración.
- Mejor color de cáscaras en las frutas mediterráneas.
- Mejor almacenamiento en árbol en clima mediterráneo: las frutas, especialmente las naranjas, mantienen bien el color y la calidad si se las deja en el árbol hasta bien entrado el verano, pero reverdecen si se hace lo mismo en clima subtropical.

### 1.2.1. Frutos

En general, todas las variedades del citrus producen frutos característicos del género, agrupados bajo el término hesperidio. La botánica define a estos

frutos como bayas modificadas en las que se distinguen: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. El exocarpo, también llamado flavedo, es la porción más externa, coloreada y presenta cavidades con aceites esenciales. El mesocarpo, que recibe el nombre de albedo por su color blanco; y el endocarpo, que presenta pelos o emergencias pluricelulares que contienen el jugo (es la parte “comestible”), se disponen de manera tal que forman las cavidades separadas en las que se disponen las semillas, llamadas lóculos. En algunos hesperidios, como la mandarina, el mesocarpo es laxo, permitiendo separar fácilmente la cáscara, formada por el exocarpo y las capas más externas del mesocarpo.

### **1.3. Relevancia en la actividad económica**

El citrus se cultiva exclusivamente por sus frutos, de gran valor comercial en la industria alimenticia. De hecho, los cítricos son las frutas de mayor valor en cuanto a comercio internacional. En la actualidad, el comercio de cítricos abarca dos grandes mercados: el de frutas frescas y el de productos procesados. El consumo en fresco representa alrededor del 70 % del consumo total de cítricos, mientras que el restante es industrializado para obtener jugos, pulpa o aceites esenciales.

#### **1.3.1. El citrus en el mercado internacional**

Si bien el citrus es cultivado en aproximadamente de 148 países alrededor del mundo (FAO 2014), mayormente entre los paralelos 40° S y 40° N debido a su origen tropical y posterior adaptación a climas templados, apenas cinco países concentran alrededor del 60 % de la producción mundial. A su vez, cerca del 70 % de la producción a nivel mundial del citrus pertenece a países del hemisferio norte, aunque Brasil, en este sentido, destaca como la excepción ya que pertenece al hemisferio sur, y según los datos de la FAO más recientes (2014), es el segundo mayor productor cítrico a nivel mundial, después de China. Existe cierto grado de complementariedad entre la oferta del hemisferio sur y el consumo del hemisferio norte: en los meses que corresponden al verano de éste último, la producción de los países boreales decrece mientras que los países del hemisferio sur disponen de cítricos en fresco para la exportación. Argentina en particular, se posiciona como el décimo mayor productor a nivel mundial, y segundo mayor productor de cítricos del hemisferio sur. En cuanto a exportaciones, es el principal exportador de limones del hemisferio sur, representando

las suyas, un 10,81 % del total exportado.

La participación por especies, no obstante, no es pareja y puede verse en las estadísticas que el cultivo de mayor volumen es el del limón, representando un 21,89 % del volumen producido a nivel mundial durante el período 2014-2015, y un 84,94 % del volumen producido en el hemisferio sur durante el mismo período. Las demás especies, si bien participan en el volumen total de producción/exportación de cítricos, lo hacen en menor medida.

### **1.3.2. El citrus en el mercado argentino**

Los cítricos son el principal grupo de frutas producidas en Argentina y el segundo en importancia en cuanto exportaciones, después de las llamadas frutas de pepita (manzanas, peras). La actividad citrícola nacional se desarrolla mayormente en el noroeste y nordeste del país. La superficie dedicada a citrus fue, en 2014, de cerca de 135.000 hectáreas, con una producción total de alrededor de 2,9 millones de toneladas, correspondiendo el grueso de la producción a limones y limas, con más del 48 %. Le siguen la naranja, con 31,15 %; las mandarinas, con el 13,4 % y los pomelos con el 6,85 %.

En el NOA, las principales provincias productoras, en orden de importancia son Tucumán, Salta, Jujuy y en menor medida, Catamarca. Este grupo es responsable de cerca del 56 % de la producción nacional de cítricos, siendo su mayor aporte el de limón y pomelo.

En el NEA, por otra parte, las plantaciones se concentran principalmente en Entre Ríos y Corrientes, pero con una producción orientada a mandarinas y naranjas, siendo escasa o nula la participación de otras especies. Chaco y Formosa, Misiones y el norte de Buenos Aires, si bien lo hacen en menor medida, no contribuyen significativamente en la producción de este grupo, que contabiliza por alrededor del 44 % de la producción nacional de cítricos.

#### **1.3.2.1. Tucumán**

Analizando la composición de la producción de cítricos en la provincia de Tucumán, puede observarse que predomina la producción de limones, representando ésta, cerca del 96 % de la producción total. En gran parte debido a esto, hay una mayor disponibilidad de información comercial para el limón en Tucumán que para las demás especies y por lo que se hará énfasis en el cultivo del mismo. La información comercial del limón agrupa a limas y limones sin distinción entre las frutas y variedades, pero aun así pueden mencionarse algu-

nas características y destacar algunas variedades comerciales de cada una. Los limones son todas las especies y variedades que responden al nombre científico de *Citrus limon* sbsp *burm*, o los sinónimos como puede ser el *C. limonum* sbsp *risso*. Algunas variedades comerciales son:

- \* *C. limon* sbsp *Verna*: variedad obtenida en España, que ocupa más de la mitad de la producción de cítricos. Los frutos son grandes, con un mamelón apical muy grande, corteza rugosa, buen contenido de jugo y pocas semillas. El árbol es vigoroso y con pocas espinas y da sus frutos en verano.
- \* *C. limon* sbsp *Primofiori*: también obtenida en España, posee un árbol más grande que el *Verna*. El fruto tiene el mamelón apical pequeño, corteza lisa, buen contenido de jugo, más semillas y menor acidez. Se encuentra en España, Italia, Argentina y Uruguay.
- \* *C. limon* sbsp *Eureka*: obtenida en California en 1858, es una variedad de plantas vigorosas, pocas espinas y muy productiva, con producción bianual, distribuidas en invierno alrededor de un 70 % y en verano un 30 %. Los frutos son grandes, con un pequeño cuello en la zona peduncular y un pezón en la estilar, con pocas semillas, buen contenido de jugo y acidez. Se usa principalmente para consumo en fresco, aunque también posee buen rendimiento industrial. Se produce en Estados Unidos, Australia, Sudáfrica, Argentina e Israel.
- \* *C. limon* sbsp *Lisboa*: variedad de plantas vigorosas, con espinas y muy productiva, con dos producciones en el año, la de invierno con un 80 % y la de verano con un 20 %. Los frutos son de buena forma y tamaño, con un pequeño cuello en la zona peduncular y un pezón en la estilar, con semillas, buen rendimiento en jugo y elevada acidez. Se utiliza para consumo en fresco e industria.
- \* *C. limon* sbsp *Limoneira*: variedad de planta vigorosa y muy productiva, con espinas. Posee dos producciones importantes en el año, distribuidas en invierno (70 %) y verano (30 %). Sus frutos son de tamaño mediano a chico, de buena forma, con pocas semillas, con buen contenido de jugo y acidez y con elevado contenido en aceites esenciales, lo que la hace conveniente para la industria.

La producción provincial siempre ha implicado 40 % de la producción cítrica nacional y entre el 70 y el 95 % de la cantidad de limones producida en el país. Según los datos del censo 2005, último realizado hasta la fecha, las variedades más relevantes de limones producidos en la provincia son: Eureka 35 %, Lisboa y Limoneira 25 %, Génova 11 % y el resto 4 %.

El espacio dedicado al cultivo de limón en Tucumán se distribuye en once departamentos, desde Burreyacú, al Noreste de la provincia, hasta La Cocha, al sur. Dadas las características agroecológicas, cuenta con una productividad superior a las del resto del país. El área está localizada entre 26° y 28° de latitud sur y se extiende a lo largo de la zona pedemontana, en una altitud promedio entre 300 y 500 metros. El clima es moderado y seco en invierno y al comienzo de la primavera, y cálido y húmedo en el verano, con una temperatura promedio anual de 19 °C. En la zona cítrica, el promedio anual de lluvias es de 800 a 1.500 mm, las que se producen generalmente en verano. Dichas características climáticas hacen que esta área sea diferente de las áreas cultivadas con limón en California, España e Italia. El destino de limón tucumano depende de la calidad y las perspectivas de colocación en el exterior. Primordialmente se dirige a la industria, que en 1990 acaparaba 80 % de lo producido, proporción que al promediar ha ido en descenso, como consecuencia del avance de las exportaciones de limones frescos. La demanda interna es poco relevante, limitándose básicamente a la fruta fresca. El consumo aparente es de casi 1,2 kilogramos por año por habitante. El principal centro de consumo es Buenos Aires (50 % de la fruta), en donde el producto se comercializa fundamentalmente a través del Mercado Central, aunque en los últimos años ha cobrado importancia la venta directa a grandes cadenas de supermercados. Tucumán domina el mercado del limón y determina la tendencia del destino de la producción a nivel nacional.



Production / Production / Producción<sup>1</sup>

Table 4 - Lemons and limes  
Tableau 4 - Citrons et limettes  
Cuadro 4 - Limones y limas

	1981/82 1989/90 average	1991/92 1999/00 average	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 preliminary
(... thousand tonnes / milliers de tonnes / miles de toneladas ...)									
<b>WORLD</b>	<b>5843.0</b>	<b>8521.9</b>	<b>12520.3</b>	<b>12924.8</b>	<b>12756.8</b>	<b>13414.3</b>	<b>13303.5</b>	<b>12943.4</b>	<b>13172.3</b>
<b>Northern Hemisphere<sup>2</sup></b>	<b>4667.0</b>	<b>6568.0</b>	<b>9400.7</b>	<b>9942.2</b>	<b>10001.8</b>	<b>9972.5</b>	<b>9996.7</b>	<b>9771.5</b>	<b>10490.3</b>
USA	811.3	789.5	561.9	827.4	882.0	920.0	850.0	912.0	832.0
Mediterranean Region	2178.4	2502.6	2615.6	2714.7	2688.3	2933.1	2927.7	2675.9	3173.6
Cyprus	48.1	36.8	9.4	8.0	10.8	18.9	11.6	14.8	9.0
Greece	167.2	141.8	45.0	29.6	33.0	46.0	45.0	55.5	79.0
Italy	756.1	657.8	553.5	518.5	544.5	544.9	458.2	460.0	545.0
Spain	562.4	702.8	750.0	687.9	558.2	717.9	736.2	666.7	1057.0
Algeria	7.5	19.3	41.4	41.4	44.0	44.0	41.4	41.4	41.0
Egypt	159.8	305.8	324.5	329.7	320.0	320.0	320.0	323.0	301.0
Morocco	14.7	12.2	35.0	42.0	42.0	80.0	154.4	47.5	41.0
Tunisia	18.7	15.7	37.5	41.8	37.3	47.5	49.0	44.0	58.0
Israel	56.1	20.8	51.0	62.6	65.1	62.7	68.6	58.8	64.0
Lebanon	53.6	95.1	114.0	115.0	85.0	80.0	82.0	82.0	82.0
Syrian Arab Republic	18.3	59.4	137.3	140.6	142.2	161.6	147.6	148.0	148.0
Turkey	273.9	356.3	495.0	672.0	783.6	787.1	790.2	710.2	725.0
Others	41.8	78.9	22.0	25.5	22.5	22.5	23.5	24.0	23.6
Portugal	15.3	10.4	11.2	13.0	12.8	13.1	14.0	14.0	14.0
Guatemala	98.9	125.2	107.3	115.6	121.6	109.1	112.0	110.0	110.0
Mexico	661.1	1032.0	2229.0	1966.0	1891.0	2133.0	2055.0	1950.0	2250.0
Iran, Islamic Rep. of	168.7	779.1	694.9	1012.4	1016.2	992.4	997.1	1023.7	1024.0
China	2.1	14.3	197.0	227.5	250.0	300.0	350.0	400.0	400.0
India	538.9	1078.0	2501.7	2571.5	2629.2	2108.0	2200.0	2200.0	2200.0
Thailand	1.0	74.7	162.7	159.1	171.1	120.4	130.0	130.0	130.0
Others	191.3	162.3	319.3	335.0	339.6	343.3	361.0	356.0	356.7
<b>Southern Hemisphere<sup>3</sup></b>	<b>1176.0</b>	<b>1953.9</b>	<b>3119.6</b>	<b>2982.6</b>	<b>2755.1</b>	<b>3441.8</b>	<b>3306.8</b>	<b>3171.9</b>	<b>2682.0</b>
Argentina	432.5	816.8	1360.0	1350.0	1000.0	1550.0	1300.0	1300.0	700.0
Bolivia	35.9	60.5	28.4	28.6	17.8	17.9	19.0	19.0	26.0
Brazil	331.0	508.1	965.3	899.8	1020.7	1126.7	1208.3	1100.0	1100.0
Chile	67.6	110.8	166.0	162.0	155.0	153.0	160.0	160.0	160.0
Peru	118.1	241.2	236.3	208.0	233.0	224.7	234.1	230.0	275.0
Uruguay	34.4	44.4	33.0	42.0	38.0	38.0	47.0	40.0	31.0
Australia	37.8	34.4	35.9	24.8	24.8	24.8	25.0	25.0	25.0
South Africa	56.8	76.1	230.0	214.0	216.0	257.0	260.0	245.0	312.0
Others	62.0	61.7	64.8	53.4	49.7	49.7	53.5	52.9	53.0

<sup>1</sup> Crop year totals include the northern hemisphere harvests starting in autumn of the first year shown and the southern hemisphere harvest in the following year.  
<sup>2</sup> The season extends approximately from October/November to May/June.  
<sup>3</sup> The season extends approximately from April/May to November/December.

Figura 1.2: Valores de la producción mundial de Limones y limas, FAO 2016.

Exports / Exportations / Exportaciones<sup>1</sup>

Table 9 - Lemons and limes  
Tableau 9 - Citrons et limettes  
Cuadro 9 - Limones y limas

	1981/82 1989/90 average	1991/92 1999/00 average	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 preliminary
( ... thousand tonnes / milliers de tonnes / miles de toneladas ... )									
<b>WORLD</b>	<b>1018.0</b>	<b>1266.6</b>	<b>2386.6</b>	<b>2294.1</b>	<b>2328.8</b>	<b>2421.1</b>	<b>2674.3</b>	<b>2582.3</b>	<b>2603.5</b>
<b>Northern Hemisphere<sup>2</sup></b>	<b>933.3</b>	<b>1051.8</b>	<b>1712.9</b>	<b>1787.3</b>	<b>1789.1</b>	<b>1867.7</b>	<b>2113.0</b>	<b>1995.1</b>	<b>2083.6</b>
USA	143.7	123.6	157.0	93.0	93.0	102.0	95.0	110.0	120.0
Mediterranean Region	707.6	644.0	847.8	988.7	932.1	1057.0	1094.1	1025.2	1168.9
Cyprus	34.4	23.7	4.0	5.0	3.1	2.7	3.0	3.4	2.0
Greece	59.7	36.8	2.5	0.7	0.8	2.0	3.3	7.3	8.0
Italy	115.8	32.6	38.5	63.6	39.5	46.7	41.3	38.2	30.0
Spain	347.5	392.3	445.0	495.4	385.3	474.6	539.0	530.1	635.0
Egypt	0.8	7.2	22.9	26.2	29.2	43.0	29.2	32.2	32.2
Lebanon	10.2	7.2	39.2	32.4	25.0	24.7	13.4	13.0	19.0
Turkey	105.2	129.2	250.0	330.3	423.4	438.4	437.7	375.8	409.0
Others	33.9	15.0	45.8	35.2	25.8	25.0	27.2	25.1	33.7
Portugal	0.0	1.1	2.6	1.4	1.2	2.7	5.0	3.5	5.0
Mexico	25.6	162.0	500.0	445.0	456.0	432.0	625.0	525.0	515.0
China	0.1	0.3	9.4	4.7	12.2	7.3	13.2	14.9	5.0
India	0.0	1.3	26.2	24.2	30.9	24.6	22.1	20.7	19.0
Others	56.4	119.6	169.9	230.4	263.8	242.1	258.6	295.8	250.7
<b>Southern Hemisphere<sup>3</sup></b>	<b>84.7</b>	<b>214.7</b>	<b>673.7</b>	<b>506.7</b>	<b>539.7</b>	<b>553.4</b>	<b>561.3</b>	<b>587.2</b>	<b>519.9</b>
Argentina	35.3	137.1	380.0	250.0	264.0	255.0	267.0	280.0	160.0
Brazil	2.5	3.7	60.3	66.4	63.1	66.5	66.0	78.6	92.0
Chile	3.2	8.6	41.3	36.9	45.0	46.5	39.5	33.8	43.0
Ecuador	0.0	0.7	6.3	5.4	1.8	3.9	5.0	1.9	1.0
Peru	0.0	0.0	1.7	1.8	2.4	3.1	2.8	3.4	4.0
Uruguay	11.5	18.9	14.3	13.8	15.5	13.9	13.8	12.3	18.0
Australia	1.5	3.6	0.9	1.0	1.1	0.3	0.4	0.5	0.9
South Africa	27.9	39.0	166.0	130.0	145.0	162.0	165.0	175.0	198.0
Others	2.7	3.2	2.9	1.5	1.9	2.3	1.8	1.7	3.0

<sup>1</sup> On a crop year basis.  
<sup>2</sup> On November-October crop year basis.  
<sup>3</sup> Data refer to calendar year, second part of split year.

Figura 1.3: Valores de las exportaciones mundiales de limones y limas acorde a los principales países, FAO 2016.

## 1.4. Huang long bin (HLB)

El HLB es causado por bacterias gram-negativas del género *Candidatus Liberibacter*. El término *Candidatus* designa microorganismos que no es posible cultivar en laboratorio mediante técnicas tradicionales, lo cual dificulta considerablemente su estudio y caracterización. Se reconocen tres tipos causantes de esta enfermedad: *Ca. L. asiaticus* (Las), *Ca. L. africanus* (Laf) y *Ca. L. americanus* (Lam) [2]. Fue descrita en 1919 por Reinking, en el sur de China [3], como “enfermedad del brote amarillo”, aunque en ese momento se desconocía su etiología. Posteriormente, se demostró que en 1936, ya se había dispersado y constituía un serio problema. Si bien la enfermedad existe y se conoce desde hace tiempo en Asia, estaba confinada en esa región, pero hace relativamente poco tiempo, ha superado todas las fronteras y se encuentra presente en más de 40 países de diferentes continentes. En el caso americano, en el año 2004 se detecta por primera vez la enfermedad, en San Pablo, Brasil [4]; en 2005 en Florida, EEUU; en 2007 en Cuba y en los estados de Minas Gerais y Paraná en Brasil; en 2008 en Santo Domingo y en Louisiana, EE.UU.; en 2009 en Belice, en los estados de Georgia

y Carolina del Sur, EEUU. En 2009 se identifica también en México, en Jamaica, Guatemala y Puerto Rico y en 2010 se detectó en Honduras y Nicaragua. En Florida, la situación es considerada de extrema gravedad: se estima que entre 2004 y 2011 disminuyó un 28 % la superficie citrícola comercial y con ella, el número de árboles en producción, siendo el HLB una de las principales razones [5]. Lo que es más, debido al efecto devastador de la enfermedad en los citrus y su eficiente transmisión por medio de vectores psílidos, las *Ca. L. africanus* y *Ca. L. asiaticus* han sido clasificadas por el gobierno de los EEUU como “agentes selectos” de potencial bioterrorista. Los patógenos son transmitidos por dos insectos psílidos, *Trioza erytreae* (Del Guercio) en África y *Diaphorina citri* (Kuwayama) en Asia. Estos son responsables de la amplia distribución geográfica del HLB en estas regiones. Tanto Australia como las regiones del mediterráneo están libres de los dos tipos de vectores. Sin embargo, *D. citri*, el vector asiático, se encuentra ampliamente distribuido en América y el caribe: ha estado presente en Brasil por más de 50 años y menos de 15 en Florida y Texas [4].

Las bacterias son introducidas por en el floema de la planta hospedera y, al moverse a través del sistema vascular, la contaminan en su totalidad. En etapas tempranas de la enfermedad, los síntomas se manifiestan como amarillamiento de las nervaduras en las hojas y la aparición de manchas de tipo “salpicado” en patrones irregulares. Este síntoma, no obstante, y contrario a lo que se esperaría, dificulta en muchos casos el diagnóstico de la enfermedad puesto que es muy similar al observado en árboles afectados por Tristeza o por Gomosis. Las hojas, además de las manchas mencionadas, pueden presentar disminuciones en tamaño que, combinadas con las manchas cloróticas, pueden llevar a pensar que se trata de una deficiencia de minerales como zinc, hierro o magnesio.



Figura 1.4: Clorosis causada por deficiencia de zinc (izquierda) y deficiencia de magnesio (derecha).

El amarillamiento puede aparecer inicialmente en un solo brote o rama, pero suele extenderse gradualmente a la totalidad del árbol con el paso del tiempo, especialmente en árboles jóvenes. Es común la desecación de las ramas afecta-

das, contribuyendo a la disminución del rendimiento del árbol en relativamente poco tiempo.

Las frutas afectadas presentan semillas abortadas, un sabor intensamente amargo y a menudo disminuyen tanto en tamaño como en cantidad y crecen deformes, con un mesocarpo mayor de lo normal y generalmente invadiendo gran parte del endocarpo, de manera tal que parece que las frutas afectadas crecen de un solo lado. Además, estas frutas no desarrollan su color natural del todo, permaneciendo verdes total o parcialmente, aun cuando maduran, aunque la mayoría cae del árbol prematuramente. Es por esto que originalmente a esta enfermedad se la llamó "Greening" (en inglés, enverdecimiento). Los sistemas radiculares de los árboles infectados comienzan a mostrar un pobre desarrollo y el crecimiento de nuevas raíces puede verse suprimido totalmente. Los árboles maduros infectados empiezan a declinar y se vuelven improductivos en poco tiempo.

La evolución de la severidad de los síntomas puede ser bastante rápida, resultando en una alta prevalencia de los mismos, distribuída por todo el dosel forestal. Se han observado síntomas severos entre 1 y 5 años desde la aparición de los primeros síntomas, dependiendo de la edad del árbol al momento de la infección y de la cantidad de infecciones por árbol, que suelen ser múltiples.

En general, la enfermedad se propaga rápidamente, sobre todo en cultivos donde no se toman medidas de control de los psílidos vectores, llegando a alcanzar una incidencia de más del 95 % en tan poco como 2-3 años después de la primera infección. En cultivos tratados con insecticidas convencionales, el factor de incidencia alcanzó, en el mismo período, el 74 %; mientras que en cultivos tratados con insecticidas sistémicos inyectados mensualmente en los troncos, este valor bajó al 24 % [6].



Figura 1.5: Manchas producidas por Huanglongbing en hojas (izquierda) y enverdecimiento en frutos (derecha) de naranja dulce.

## 1.5. Diagnósticos actuales de HLB

En esta sección se destacan muy brevemente los principales métodos actuales utilizados para el diagnóstico del HLB. Existen algunas revisiones bibliográficas al respecto, entre las que destaco el trabajo de Arredondo Valdes et al. [7], el cual tomé como base para esta sección.

### 1.5.1. Técnicas de microscopía para detectar HLB

Los síntomas del HLB en plantas de citrus son difíciles de identificar. Éstos pueden incluir, manchas amarillas, hojas moteadas de manchas, frutas con crecimiento desperejo e inversión de colores y semillas abortadas. Si bien todos son síntomas, no siempre ocurren juntos en un mismo árbol [8]. Dichas características pueden ser distorsionadas o enmascaradas por factores bióticos y abióticos [9]. Desde la década de 1970 se usan técnicas de microscopía, incluyendo microscopía óptica y de transmisión (TEM). La aplicación del TEM en tejidos infectados revelaron que la bacteria posee una pared celular del tipo Gram negativa y reside exclusivamente dentro de los floemas del árbol.

### 1.5.2. Técnicas moleculares para detectar HLB

Al hablar sobre técnicas moleculares cuantitativas, cuando se menciona la sensibilidad se refiere a la mínima cantidad de un microorganismo presente en la muestra. Algunos reportes mostraron sensibilidades en el rango comprendido entre  $10$  y  $10^6$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) [10]. Las técnicas mayormente usadas son ELISA, PCR y PCR cuantitativa (qPCR). También se pueden encontrar otras, inmunofluorescencia (IF), citometría de flujo (FC) y microarrays de ADN.

Para la detección del HLB se usaron dos tipos de PCR. El primero se basa en la secuencia 16S rDNA. El segundo tipo, se centra en la región nusG-rplK del operon (par primer A2 y J5; par primer MHO353 y MHO354) [11].

La técnica qPCR ofrece sensibilidad y mayor rapidez en la detección que la PCR convencional. Se reportó que la qPCR presentó una sensibilidad 10 veces mayor comparada a la *nested* PCR y de entre 100 a 1000 veces relativa a la PCR convencional al evaluar la bacteria del HLB [12]. Por otro lado, la técnica denominada PCR cuantitativa de fase reversa (qRT-PCR) mostró una sensibilidad 10 veces mayor amplificando 16S RNA que la qPCR cuando amplifica 16S rDNA.

Otros métodos como el DNA dot y Southern hybridization fueron empleados por [13] para detectar HLB.

### **1.5.3. Técnicas espectroscópicas para detectar HLB**

Si bien las técnicas del tipo PCR son las más precisas para determinar la infección en una planta, son complicadas y consumen mucho tiempo. Además, antes de usarlas es necesario identificar visualmente las plantas enfermas. Esta identificación tiene una exactitud de aproximadamente entre un 47 y 59% [14]. Tomando en cuenta esta problemática, se estudió el espectro electromagnético que reflejan las plantas. Se encontró que algunas regiones específicas del espectro proveen información sobre el estado fisiológico de las plantas. Consecuentemente, plantas enfermas muestran un espectro distinto al de plantas sanas sin stress. La reflexión en las copas de los árboles en las regiones visibles e infrarrojas, pueden ser un indicador de stress en las plantas [15] [16].

### **1.5.4. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) para detectar HLB**

Uno de los síntomas asociados al HLB es la acumulación de almidón en las hojas. Si bien se lo usa como herramienta de diagnóstico, este proceso también puede deberse a deficiencias nutricionales e infecciones virales [17].

Las técnicas de análisis de metabolitos pudieron identificar cambios en el perfil metabólico de diferentes variedades de citrus, incluyendo aquellas infectadas con HLB [9] [18]. Para la determinación de los perfiles se utilizan equipos de cromatografía gaseosa acoplado a espectrógrafo de masa (GC/MS) o también espectrómetros de movilidad diferencial acoplados a masa (DMS/MS).

Actualmente, lo que se busca es la combinación de instrumentos que sirvan tanto para el campo como para el laboratorio o que al menos se haga un primer análisis en campo.

### **1.5.5. Dispositivos de flujo lateral para detectar HLB**

Rigano et al. [19] combinó una técnica molecular, Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), con una tira de flujo lateral (LFD), con lo que pudo observar la amplificación del analito sin necesidad del gel para electroforesis. La sensibilidad de esta técnica es de 10 pg, esto fue comprobado mediante real-

time PCR. Este método de detección se probó con tejidos de plantas e insectos con HLB.

## 1.6. Algunos métodos para el control del HLB

### 1.6.1. Nutricionales

A principios del siglo XX se creía que la causa del contagio se debía a un bajo nivel nutricional, sequedad del suelo y otros factores abióticos. Por ello, los primeros intentos de contrarrestar los efectos de la enfermedad fue mediante la aplicación de los llamados micronutrientes. Entre ellos podemos encontrar al sulfato de cinc ( $ZnSO_4$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ), boro ( $H_3BO_3$ ), sulfato de calcio ( $CaSO_4$ ), sulfato férrico ( $Fe_2[SO_4]_3$ ) y potasio fosfato ( $K_2HPO_4$ ). El principal objetivo del enfoque nutricional es prolongar la producción de fruta en plantas infectadas con HLB y así evitar o extender el tiempo antes de sacar la planta del campo. Este método se desestimó dado que no se notó una mejora en la producción comparada a los controles y además permanecen en el campo como focos infecciosos [20].

### 1.6.2. Control del vector

Mientras se avanza en el desarrollo de variedades resistentes, una de las mejores estrategias contra el HLB es el control sobre el insecto vector el psílido *Diaforina citri* [21]. A nivel global, existe un consenso en tres formas generales de manejar el HLB: 1) sembrar material certificado, 2) control sobre la población del vector y 3) la erradicación de árboles infectados. Pero lo más importante a considerar es que prevenir la entrada del HLB es mucho más fácil y económico que intentar controlarlo o erradicarlo. El control de la población del vector se puede hacer de diversas maneras. Una de ellas es el uso de pesticidas, aplicando entre 8 y 12 veces al año. Algunos de los pesticidas más efectivos son aquellos de amplio espectro, como los piretroides, organofosforados y neonicotinoides [22]. Otra forma de control, es el llamado control biológico clásico donde se introduce o promueve el desarrollo del enemigo natural de la plaga a erradicar. Este enfoque involucra la modificación de las prácticas productivas para promover la supervivencia del agente de control. Estas modificaciones incluyen el cambio de pesticidas y la manipulación del campo [23].

### 1.6.3. Control químico

Otra de las estrategias para controlar el HLB es el uso de antibióticos aplicados de diversas maneras, ya sea inyectado en los árboles o dispersos sobre hojas y tronco. Los estudios tienden a mostrar este enfoque como una estrategia efectiva solo a corto plazo y no sustentable para el control o erradicación del HLB [3] [24]. Por otro lado, Canales et al. [25] utilizó unos compuestos esteroideos llamados Brassinoesteroides como forma de controlar el HLB. Las plantas infectadas con la variedad "Las" que fueron tratadas con estos compuestos mostraron una reducción en la población de bacterias. Los resultados de ese trabajo sugieren que los esteroides promovieron la transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta.

### 1.6.4. Control con variedades resistentes

La elección del rizoma es crucial para la industria del citrus. Además de buscar plantas con mucha productividad, se necesitan variedades capaces de soportar stress tanto biótico como abiótico. Para ello, se realizan estudios donde se analiza el grado de tolerancia de las distintas variedades de citrus frente a una enfermedad o stress [26] [27].

## 1.7. Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura en:

Compuestos fenólicos flavonoides: donde se incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, dihidroflavonoles e isoflavonoides.

Compuestos fenólicos no flavonoides: fenólicos simples, ácidos benzoicos, acetofenonas, ácido fenol acéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, benzofenonas, estilbencenos, xantonas.

### 1.7.1. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, derivados del 2-fenil-benzil- $\gamma$ -pirona, presente en todo el reino de las plantas. Se conocen alrededor de 9000 compuestos de este grupo [28].

Son los polifenoles más comunes en las plantas y se distribuyen en varias subfamilias. Su estructura básica (fl aván) consta de dos grupos fenilo (anillo A



y anillo B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C). En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos. Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las 2 clases principales de flavonoides. Entre los que tienen el grupo encontramos flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles, antocianidinas, proantocianidias, etc. Los que no tienen el grupo pueden ser las flavonas, isoflavonas y las flavanonas.

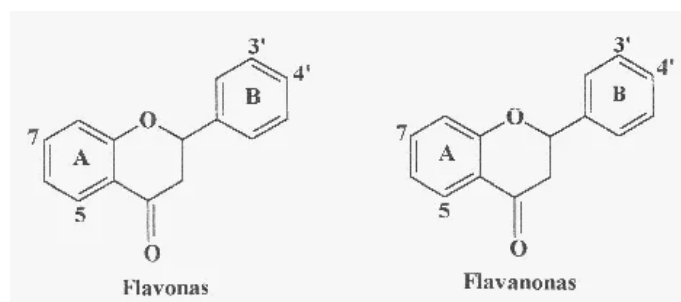


Figura 1.6: Estructura química general de las flavonas y flavanonas

### 1.7.2. Actividad Biológica

Una de las funciones indiscutidas de los flavonoides y de los polifenoles relacionados, es su rol de protección de las plantas contra la invasión microbiana. Esto no solo involucra su presencia como elemento constitutivo de las plantas, sino su acumulación como fitoalexinas en respuesta al ataque microbiano [29]. Participan también en la protección de las plantas contra estrés bióticos (herbívoros, patógenos) y abióticos (radiación UV, calor), y debido a sus propiedades antioxidantes, también mantienen el estado redox de las células. La actividad antioxidante de los flavonoides se debe a la estructura de la molécula: la presencia de dobles enlaces conjugados y la presencia de grupos funcionales en los anillos. Los flavonoides reducen la producción y “quenchean” las especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de: 1. Supresión del oxígeno singlete; 2. Inhibición de las enzimas que generan ROS (ciclooxigenasa, lipoxigenasa, mono-oxigenasa, xantina oxidasa); 3. Quelando iones de metales de transición, lo que podrían catalizar la producción de ROS; 4. “quencheando” cascadas de reacciones de radicales libres en la peroxidación de lípidos; 5. En el “reciclado” de otros

oxidantes [30]

## Capítulo 2

# Sensores y Biosensores

*Al memorizar algo aumentamos el  
desorden del universo.*

Stephen Hawking

## 2.1. Introducción

Por un lado, orientado al  $H_2O_2$  ya que de esta manera se miden tanto la glucosa en sangre y/o fluidos como los flavonoides. También nos brinda la posibilidad de medir el stress celular en los cultivos de tejidos como en plantas, y por el otro realiza una revisión crítica de la aplicación de la nanotecnología para el desarrollo de biosensores de afinidad.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una pequeña molécula permeable a membranas que desempeña un papel importante en la industria, como la farmacéutica, la minería, el medio ambiente y los alimentos. También se genera como subproducto de una amplia gama de procesos biológicos y se sugiere participar en la función y la transducción de señal de las células. El  $H_2O_2$  puede ser generado por enzimas tales como glucosa oxidasa (GOx), alcohol oxidasa (AOx), lactato oxidasa (LOx), urato oxidasa (UOx), colesterol oxidasa (ChoOx), d-aminoácido oxidasa (DAAO), glutamato oxidasa (GLOx), lisina oxidasa (LyOx), oxalato oxidasa (OxaOx), etc. Se puede observar la creciente necesidad de un método rápido y confiable para la detección de  $H_2O_2$ . Varios métodos, como la titrimetría [31], espectrometría [32], quimioluminiscencia [33], fluorimetría [34], cromatografía [35] y electroquímica [36], han sido reportados a lo largo de los años para este propósito. Entre estos métodos, las técnicas electroquímicas son preferibles debido a su simplicidad, bajo costo, alta sensibilidad y selectividad. Es importante introducir aquí un concepto clave: sensores.

## 2.2. Nanoestructuras para sensado de $H_2O_2$

De acuerdo con Xueji Zhang [37], los sensores son pequeños dispositivos que incorporan un elemento de reconocimiento con un transductor de señal y se pueden usar para la medición directa del analito en una muestra. Entre el enorme grupo de sensores químicos, el sensor electroquímico representa una subclase importante. Una clase especial entre los sensores electroquímicos son los denominados biosensores enzimáticos, donde la electrocatálisis de  $H_2O_2$  se realiza mediante enzimas inmovilizadas tales como la peroxidasa de rábano (HRP) y la hemoglobina (Hb) [38]. Sin embargo, estos electrodos mostraron muchas desventajas como la estabilidad a largo plazo, debido principalmente a la degradación de las enzimas inmovilizadas en la superficie. Por lo tanto, cada vez hay más intentos de desarrollar sensores no enzimáticos construidos a partir de materiales nanoestructurados. En los últimos años, los electrodos mo-

dificados con nanopartículas metálicas (NP) como las NP de platino (PtNPs), las de oro (AuNPs), y las de plata (AgNPs), se han utilizado ampliamente para los sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no enzimáticos. Por lo general, muestran grandes áreas de superficie específica, conductividades excelentes y actividades electrocatalíticas excepcionales [39]. La investigación actual sobre la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se centra principalmente en modificaciones de electrodos con el fin de disminuir el sobrepotencial y aumentar la cinética de transferencia de electrones. Los sensores y biosensores que incorporan nanomateriales han demostrado un rendimiento superior en comparación con sus contrapartes convencionales [40]. Los nanomateriales se pueden adaptar aún más con moléculas orgánicas o inorgánicas para mejorar sus capacidades de detección. [41]. El objetivo de este capítulo es obtener una visión general de los nanomateriales, moléculas, polímeros, electrodos y métodos de transducción utilizados en los dispositivos de detección  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Este capítulo se enfoca en sensores electroquímicos y se compara su desempeño al usar su: sensibilidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$  expresada como  $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; límite de detección (LOD) en  $\mu\text{M}$ ; rango lineal (LR) y el principio de transducción empleado al medir. El LOD es la concentración de analito más baja que se detecta de manera fiable, es decir, se distingue de blanco. El método más común para estimar su valor consiste en medir varios espacios en blanco, determinando su media y desviación estándar (SD); entonces LOD se calcula como la media del blanco + 3 SD. Un documento corto pero bueno y conciso que se refiere a estos términos fue escrito por Armbruster et al. [42].

Para comparar el rendimiento de los diferentes sensores, en cada tabla se citan el LOD, el LR, la sensibilidad junto con una breve descripción del nanomaterial empleado. Entre los materiales inorgánicos incluimos (en orden de aparición) hexacianoferratos metálicos, azul prusiano y sus análogos; nanoestructuras metálicas, especialmente plata y platino; nanoestructuras de óxidos metálicos, cobre masculino, óxido de titanio, hierro y manganeso. Por último, presentamos nanoestructuras mixtas, que incluyen polímeros conductores, grafeno, nanotubos de carbono, etc. En cuanto a las biomoléculas, incluimos el más comúnmente utilizado para  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos son un tipo de las llamadas "hemoproteínas", como el caballo rábano peroxidasa (HRP). Dentro de esta última sección, también incluimos los nanomateriales utilizados junto con las biomoléculas para mejorar el rendimiento del sensor.

Se debe tomar nota con respecto a la terminología. Muchos autores describen sus dispositivos usando términos como biosensor, cuando no hay un reactivo

biológico para realizar la detección de señal. Aquí nos referimos a los biosensores solo cuando la detección del analito es llevada a cabo por una biomolécula tal como una enzima. Nuestra intención es presentar un documento donde el lector pueda captar una idea general sobre los diferentes sensores empleados para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 2.2.1. Hexacianoferrato metálicos

El Prussian blue (PB) es bien conocido como uno de los primeros hexacianometalatos de metales de transición de valencia mixta con la fórmula de  $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ . Las características peculiares de la forma reducida del PB, el Prussian White  $\text{Fe}_4^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$  (PW), que es capaz de catalizar la reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno a bajos potenciales aplicados sobre el electrodo de trabajo (sobrepotencial), y esto es crucial para la aplicación de un sensor en muestras reales evitando la interferencia de sustancias coexistentes (como glucosa, ácido ascórbico, ácido úrico, entre otros). Una característica clave de este material es su estructura cristalina, sobre todo cuando se encuentra como nanopartículas (PBNPs) (figura 2.1) que permite que solo moléculas pequeñas como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  penetren en la red cristalina. Su alta actividad electrocatalítica, es decir, su capacidad de reducir el peróxido de hidrógeno a muy bajo sobrepotencial, y la selectividad hacia el  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo convierte en una "peroxidasa artificial"[43]. También presenta un comportamiento electrocromático muy interesante (se vuelve incoloro cuando se lo reduce al llamado PW y verde pálido cuando se oxida a la llamada estructura Prussian Green o Berlin Green) [44]. Se han informado y propuesto una serie de electrodos modificados con PB y también electrodos modificados con complejos de cianuro de iones metálicos similares para una monitorización altamente selectiva del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, hasta ahora, estos electrodos aún enfrentan una serie de inconvenientes con respecto a la estabilidad a largo plazo y la sensibilidad a los cambios de pH [45].

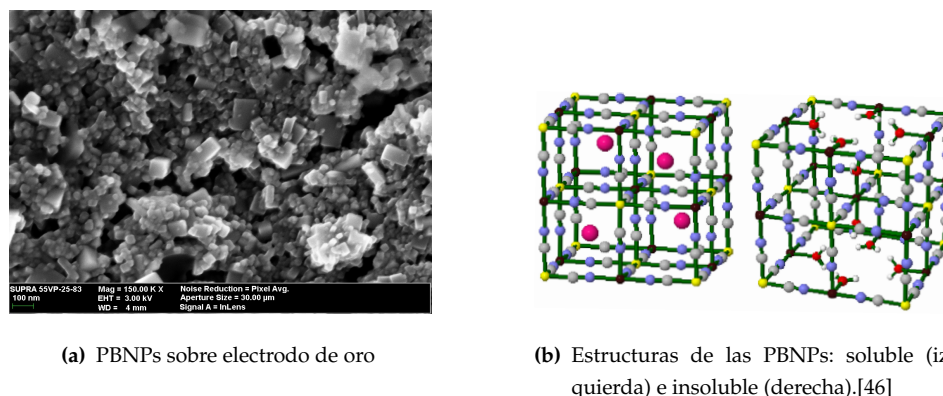
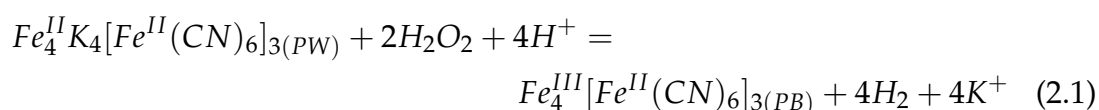


Figura 2.1: Micrografía SEM de PBNPs depositadas sobre un electrodo metálico (izquierda). Estructura cristalina de las PBNPs (derecha).

Se sabe que el PB puede depositarse electroquímicamente en la superficie de un electrodo produciendo una capa densa [47]. Este método de deposición puede realizarse aplicando un potencial o corriente constantes, o por medio de la voltametría cíclica, donde su principal ventaja de esta deposición es que permite hacerla *in-situ*. Otros dos métodos valen la pena mencionar, el auto ensamblaje que permite un gran control en la formación del PB. El otro método a mencionar es el hidrotérmico, el cual es simple y logra una gran cantidad de cristales. Si se sintetiza el PB en solución como en el último método mencionado, es posible mezclar los cristales con tintas conductoras y preparar electrodos serigrafados [48].

Estrictamente, es su forma reducida, el Prussian White (PW), el que tiene la capacidad de catalizar la reducción de  $H_2O_2$  de acuerdo con la ecuación (1) [49].



La principal ventaja del PB electrodepositado se basa en el hecho de que el peróxido de hidrógeno puede detectarse selectivamente mediante reducción electrocatalítica en presencia de oxígeno molecular, con un bajo sobrepotencial, donde la influencia de los llamados reductores (ascorbato, urato, paracetamol) en la respuesta electroquímica puede evitarse en gran medida [50]. Por ejemplo, en el trabajo de Sheng et al. [44] monitorearon  $H_2O_2$  con un rango lineal entre  $4 \mu M$  a  $1064 \mu M$  y un límite de detección de  $0.226 \mu M$  con una relación señal a ruido de 3 ( $S/N=3$ ). Se evitaron de manera efectiva los interferentes más comunes como la glucosa, el ácido ascórbico, la dopamina y el ácido úrico. Esto fue

posible mediante la formación de nanopartículas de PB (PBNPs) en nanotubos de haloisita recubiertos con polianilina (PANI) (HNT), a partir de una solución libre de oxígeno que contenía 1 mM de FeCl<sub>3</sub>, 1 mM de K<sub>3</sub> Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.025 M de HCl y 0.1 M de KCl utilizados como electrolito soporte.

El principal inconveniente del sensor basado en PB es su estabilidad limitada, especialmente en soluciones de pH neutro. Cuando se operó de manera catódica, con un sobrepotencial de 0,0 o 0,2 V, la respuesta del sensor cayó aproximadamente 40 % de su valor inicial en una solución de pH 7.3. En soluciones más ácidas (pH 5.2), la estabilidad parece ser mejor, la disminución de la sensibilidad fue del 15 % en las mismas condiciones experimentales [51]. Se han realizado intentos para optimizar el procedimiento de electrodeposición del PB con el fin de aumentar la estabilidad [52]. Sin embargo, dado que la inestabilidad es causada por la degradación química de una capa de PB durante la reducción electrocatalítica del peróxido de hidrógeno, parece que no puede evitarse por completo [53].

El cuadro 2.1 muestra los diferentes sensores nanoestructurados de hexacianoferrato metálico. Se ordenó de mayor a menor sensibilidad.

Cuadro 2.1: Hexacianoferratos metálicos<sup>b</sup>

Nanomaterial	Princ. de Transd.	Sensibilidad [ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	LR	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Ref
PB@PtNPs/GF	Amp	$40.9 \times 10^3$	–	$1.2 \times 10^{-3}$	[54]
PB NPs	Amp	$0.762 \times 10^3$	0 - 4.5 mM	0.2	[55]
PB-MWCNTs	Amp	$0.436 \times 10^3$	5 - 1645 $\mu\text{M}$	0.35	[56]
PB	Amp	$0.35 \times 10^3$	up to 2.5 mM	50	[57]
PB	CV	$0.3 \times 10^3$	–	0.5	[45]
GC-R/PB	Amp	$0.25 \times 10^3$	50 $\mu\text{M}$ 10 mM	0.1	[50]
PB@Au NPs	Amp	39.72	2 $\mu\text{M}$ - 8.56 mM	0.1	[58]
PB-PPy NWs	Amp	10	0.2 to 7.2 mM	–	[49]
NiHCF-GS	Photocurrent	3.53	2.0 $\mu\text{M}$ - 2.3 mM	1.0	[59]
CuHCF		2.34	up to 10 mM	250	[57]
PB-PANI-HNTs	Amp	0.98	4 $\mu\text{M}$ - 1064 $\mu\text{M}$	0.226	[44]
ENM	Amp	0.237	up to 100 $\mu\text{M}$	6.1	[60]
PB-RGO	Amp	0.1617	0.5 $\mu\text{M}$ - 0.7 mM	–	[61]
CPE/CFe*-RP	Amp	–	up to 0.8 mM	$33 \times 10^{-3}$	[62]
CoHCNFPs-GR	Amp	–	0.6 - 379.5 $\mu\text{M}$	0.1	[63]
PB	Amp	–	1 $\mu\text{M}$ - 10 mM	1	[47]
NiHCF	CV	–	0.2 $\mu\text{M}$ - 1.5 mM	1.2	[64]
CrHCF-SWNTs	Amp	–	0.5 $\mu\text{M}$ - 10 mM	–	[65]

<sup>b</sup> Abbreviations: Amp: amperometry, CV: cyclic voltametry

En el cuadro 2.1 se presentan las sensibilidades más altas para el uso de diferentes hexacianoferratos combinándolos con otras nanoestructuras. Su combinación con otras nanoestructuras como nanopartículas metálicas o grafeno, permite bajar el LOD a costa de perder sensibilidad. Un buen ejemplo de esta última afirmación es el LOD de 1,2 nM obtenido con una mezcla de PB, Pt NP y grafeno. El electrodo de pasta de carbón modificado con hibridación de rutenio



púrpura (CPE/CFe\*-RP) también presenta una muy buena combinación para lograr un límite de detección muy bajo de 33 nM.

### 2.2.2. Otros Hexacianoferrato metálicos

Junto al PB se han aplicado con éxito otros complejos de hexacianato de metales de transición, por ejemplo, hexacianoferrato de cobre ( $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) o hexacianoferrato de níquel y potasio ( $\text{KNi}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Zhang desarrolló un sensor fotoelectroquímico para peróxido de hidrógeno basado en el hexacianoferrato de níquel (II)-potasio (NiHCF) - hibridizado con grafeno. La ventaja que estos hexacianoferratos de valencia mixta presentan en comparación con el PB es una estructura más estable a pH neutro o ligeramente básico. Tria et al. [66] empleó un método de potencial constante para desarrollar una estructura multicapa de PB seguida de hexacianoferrato de níquel (II) como capa de estabilización. Esta estabilidad al pH básico fue estudiada por Lin et al. [64] mediante el uso de un electrodo serigrafado. Tal electrodo se modificó electroquímicamente por electrodeposición de hexacianoferrato de níquel (III) (NiHCF) sobre la superficie del electrodo usando voltametría cíclica (CV). Se ha demostrado que la película de NiHCF permanece estable después de un barrido CV de 0 a +1,0 V frente a Ag / AgCl en el rango de pH de 3 a 10. Zhang et al. [59] presentó un estudio interesante, donde desarrollaron un sensor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  basado en NiHCF. Aunque está muy bien caracterizado, lo que hace que este sensor sea diferente de otros sensores electroquímicos es el hecho de que la determinación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se basa en la cuantificación de los cambios de la fotocorriente.

Otro metal de transición que se usó para formar hexacianoferratos fue el cromo [65]. La detección amperométrica del peróxido de hidrógeno se realizó usando GCE modificado con nanocompuestos de hexacianoferrato/nanocables de carbono de pared única. El sensor desarrollado mostró una dependencia lineal con la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un rango de  $0.5 \mu\text{M}$  a 10 mM.

### 2.2.3. Nanoestructuras metálicas

El peróxido de hidrógeno se puede detectar electroquímicamente por oxidación o reducción en catalizadores metálicos. El mecanismo de detección generalmente se basa en la aplicación de un cierto sobrepotencial (vs una referencia) al electrodo de trabajo. Cuando se usan electrodos metálicos no nanoestructurados (o bulk de un determinado material), es necesario aplicar potenciales superiores a +0,9 V DC para obtener una señal del  $\text{H}_2\text{O}_2$  [67]. Los nanomateriales

pueden ofrecer un mejor rendimiento como interfaces de detección. En particular, los nanomateriales pueden ofrecer un área superficial específica más alta, una conductividad excelente, actividades electrocatalíticas y una larga estabilidad. El platino (Pt), un catalizador heterogéneo conocido y tradicional, juega un papel importante la foto- y electrocatalisis, y es ampliamente utilizado en dispositivos ópticos, electrónicos, magnéticos y de sensado. El cobre tiene una gran operabilidad, disponibilidad comercial, costo y simplicidad en su síntesis [68]. Además, exhibe excelente biocompatibilidad, por lo tanto, los electrodos de Cu son de particular interés [69]. Debido a la combinación excepcional de propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas, el nitruro de titanio (TiN) atrae mucha atención por su posible aplicación en diversos campos, como capa protectora, como los supercondensadores y como la catálisis. La literatura también ha informado sobre su uso potencial como electrodos para el sensor de pH [70] y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [71]. Las AuNPs tienen la capacidad de mejorar la conductividad eléctrica, promover la transferencia de electrones y aumentar la sensibilidad de un electrodo.

El siguiente cuadro resume algunos ejemplos del uso de nanoestructuras metálicas. El cuadro 2.2 presenta las sensibilidades en orden decreciente, donde los AgNWs ([39], [72]) muestran una sensibilidad más alta que los hexacianoferratos del cuadro 2.1 ([55]). Estas nanoestructuras metálicas también presentan un mejor LOD que los materiales del cuadro 2.1. Curiosamente, el trabajo de PtNPs escrito por Chakraborty et al. [73] mostró una baja sensibilidad pero un muy buen LOD.

Cuadro 2.2: Sensores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> basados en nanosestrucruas metálicas

Nanomaterial	Princ. de Transd.	Sensibilidad [ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	LR	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Ref
Ag NWs	Amp	$4.705 \times 10^3$	50 $\mu\text{M}$ to 10.35 mM	10	[39]
nano Pd	Amp	$1.42 \times 10^3$	1-14 $\mu\text{M}$	1	[74]
Ag NWs	Amp	749	0.2 to 1.5 mM	46	[72]
PtRu	Amp	539.01	–	1.7	[75]
PtAu		415.46	–	2.0	[75]
PtIr		404.52	–	0.8	[75]
Au NPs	Amp	52.94	10 $\mu\text{M}$ - 8mM	0.5	[76]
Pt NPs	Amp	9.15	0.5nM to 4mM	500	[73]
TiN nanofilm	Amp	3.99	$2 \times 10^{-5}$ to 3mM	–	[77]
Pt NPs/SWCNT	Amp	3.57	25 nM to 10 $\mu\text{M}$	25	[78]
Au/Pt NPs	Amp	2.92	10 to 80 $\mu\text{M}$	10	[79]
Pt/TiO <sub>2</sub>	Amp	0.85	$4 \times 10^{-6}$ to $1.25 \times 10^{-3}$ M	4	[80]
Ag NPs/ATP	Amp	–	10 $\mu\text{M}$ to 21.53 mM	2.4	[81]
nano Ag	Amp	–	4 to 36 $\mu\text{M}$	0.9	[82]
Ag NPs/GO	Amp	–	0.1 mM to 20 mM	1.9	[83]
Cu NPs/Chi/CNT	Amp	–	0.05 to 12 mM	20	[68]
Cu NPs	Amp	–	8-70 $\mu\text{M}$	3.4	[84]
TiN NRs	CV	–	0.5 $\mu\text{M}$ -2mM	0.5	[71]
Eu(tc)	Fluorescence	–	–	1.8	[85]
Eu(tc)	Fluorescence	–	6-12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	–	[86]

Lu [83] desarrolló un sensor de  $H_2O_2$  basado en las interacciones entre cadenas de ADN y un nanocompuesto, el AgNPs/GO. En este documento en particular, se destacan los diversos métodos de inmovilización involucrados en la fabricación.

Si bien el cobre tiene muchas características interesantes para el diseño de electrodos, tiene la gran desventaja de ser fácilmente oxidable. Sophia et al. [84] reportó sobre la preparación de nanopartículas de cobre (CuNPs) estabilizadas por un polímero, la polivinilpirrolidona (PVP). Al emplear un polímero para la estabilización, los autores de este trabajo evitaron la oxidación de las CuNPs. Otro factor importante aquí es la estabilidad a largo plazo del sensor, que mantuvo el 85 % de su respuesta inicial después de 1 mes de almacenamiento a temperatura ambiente. Siguiendo la idea de usar polímeros para cargar y estabilizar nanoestructuras, Li et al. [76] desarrolló un sensor libre de enzimas basado en un electrodo de oro modificado con AuNPs y compuestos de polidopamina sobre-oxidados. Aquí se destaca la versatilidad de los films de polidopamina. Se pueden formar sobre diferentes sustratos, incluidos los materiales orgánicos, lo que puede conducir a nuevos desarrollos muy interesantes, especialmente en el área de los sensores.

#### 2.2.4. Nanoestructuras de óxidos metálicos

En general, el uso de metales nobles está restringido por sus precios relativamente altos. En los últimos años, nanomateriales compuestos de metales de transición, mucho más baratos, como por ejemplo: CuO, CuS,  $Fe_3O_4$ ,  $MnO_2$ ,  $MoS_2$ , NiO, ZnO y  $TiO_2$ , se han utilizado ampliamente en la fabricación de sensores de  $H_2O_2$  no enzimáticos altamente eficientes. Estos nanomateriales de óxido metálicos presentan buenas características para el desarrollo de sensores, como la estabilidad térmica, la resistencia a la irradiación y gran flexibilidad para formar diferentes nanoestructuras. Esto último impulsó la fabricación de diferentes sensores como fotodetectores, dispositivos de ondas acústicas de superficie y biosensores. Otra propiedad importante que despierta un gran interés en el desarrollo de nanosensores con materiales de óxidos metálicos es que son ecológicos. El principal inconveniente del uso de estas nanoestructuras es que muchas de ellas requieren que se aplique un sobrepotencial para oxidar o reducir electrocatalíticamente al  $H_2O_2$  para su detección. En particular, los nanomateriales de dióxido de manganeso se consideran como uno de los materiales inorgánicos más atractivos y han llamado la atención en la química bioanalítica,

especialmente en la detección electroquímica de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , debido a su bajo costo, abundancia natural, estar libre de contaminación ambiental.

Las propiedades de las nanopartículas, especialmente las de estructura monocristalina, a menudo dependen de sus morfologías y microestructuras de superficie, como las facetas expuestas, la configuración hidroxílica de la superficie, la situación de la carga superficial, etc. Las nanopartículas cuasicúbicas de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  tienen una actividad mucho mayor en la oxidación del CO que las estructuras florales debido a la exposición exclusiva de los planos {110}. Los thin films nanoestructuradas de semiconductores de óxido metálico (MOS) ofrecen grandes posibilidades para aplicaciones de detección de gases y químicos (por ejemplo, vapores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), debido a su dependencia de la conductividad eléctrica con especies como  $\text{O}_2$ , CO y  $\text{H}_2$ .

Entre los nanomateriales, las nanopartículas magnéticas han ganado un interés creciente debido a las aplicaciones prometedoras como administración de fármacos, biosensores, etc. Hematitas ( $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), amigables con el medioambiente, son semiconductoras tipo n ( $E_g = 2.1$  eV) y la fase más termodinámicamente estable del óxido de hierro en condiciones ambientales, está atrayendo un gran interés no solo por sus propiedades únicas sino también por la versatilidad de su uso en muchos campos, como la catálisis y los sensores.

El siguiente cuadro resume varias nanoestructuras de óxidos metálicos como sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el cuadro 2.3 se puede observar que la sensibilidad máxima se obtuvo con  $\text{Co}_3\text{O}_4$  NWs reportados por Kong et al. [[87]]. Aunque estas nanoestructuras de óxido metálico muestran una gran sensibilidad, su LOD no es tan bueno como el que se presenta en las tablas 2.1 y 2.2.

Cuadro 2.3: Sensores basados en nanoestructuras de óxidos metálicos

Nanomaterial	Princ. de Transd.	Sensibilidad [ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	LR	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Ref
$\text{Co}_3\text{O}_4$ NWs	Amp	$1.14 \times 10^3$	0.015 to 0.675 mM	2.4	[87]
$\delta\text{-MnO}_2$ /CNTs	Amp	243.9	0.05 to 22 mM	1	[88]
CoOOH nanosheets	Amp	99	up to 1.6 mM	40	[89]
Co doped ZnO NPs	Amp	92.4	–	14.3	[90]
ZrO <sub>2</sub> NPs	Amp	82.13	0.05 mM–0.25 mM	–	[91]
PTBO/GCNT					
Cu <sub>2</sub> O	Amp	50.6	up to 1.5 mM	1.5	[92]
MnO <sub>2</sub>	Amp	38.2	5–600 $\mu\text{M}$	0.8	[93]
$\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ NPs	Amp	21.62	1.0 - 44.0 $\mu\text{M}$	0.4	[94]
TiO <sub>2</sub> /SiO <sub>2</sub>	Phosphorescence	–	$7.0 \times 10^{-6}$ - $7.0 \times 10^{-2}$ M	–	[95]
CuO	Amp	–	$5.0 \times 10^{-6}$ - $180.0 \times 10^{-6}$ M	1.6	[96]
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NRs	CV	–	40 $\mu\text{M}$ to 4.66 mM	–	[97]
MoS <sub>2</sub> NPs	Amp	–	$10^5$ xLOD	$2.5 \times 10^{-3}$	[98]
cobalt manganese oxide	Amp	–	0.1 to 25 mM	15	[99]
MnO <sub>2</sub>	Amp	–	2.5 $\mu\text{M}$ - 2.05 mM	12	[100]
CuNFs/MoS <sub>2</sub>	Amp	–	0.04-1.88 $\mu\text{M}$	0.021	[101]

Wang et al. logró un sensor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extremadamente sensible basado en nanopartículas  $\text{MoS}_2$  con un límite de detección tan bajo como 2.5 nM y un amplio rango lineal de 5 órdenes de magnitud (Figura 2.2). Sobre la base de este sensor, la cantidad traza de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberada de las células Raw 264.7 se registró con éxito [98].

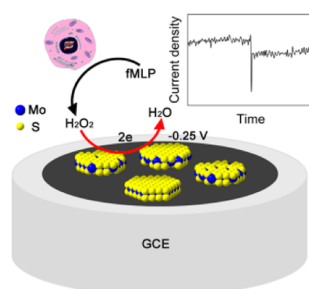


Figura 2.2: Sensor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  basado en nanopartículas de  $\text{MoS}_2$

### 2.2.5. Nanoestructuras mixtas

En esta sección, se presentan las propiedades de diferentes nanoestructuras empleadas en el mismo dispositivo. En particular, se presentan trabajos en los que a menudo se utilizan polímeros conductores, grafeno o nanotubos de carbono como materiales soporte para la fabricación de nanocompuestos complejos y materiales híbridos.

Los polímeros conductores (PC) son de gran interés debido a sus propiedades eléctricas y ópticas, que son similares a las de los metales o materiales semiconductores inorgánicos. Entre los diversos PC, el polipirrol (PPy) juega un papel importante, debido a su alta actividad electroquímica, conductividad y biocompatibilidad [102].

El grafeno, una sola capa de átomos de carbono en una red bidimensional muy compacta, ha atraído una enorme atención recientemente. El material es conocido por sus excelentes propiedades eléctricas, como el gran área de superficie activa (área redox) y la alta movilidad de sus electrones. La deposición capa por capa (LBL) es un método poderoso y versátil para la preparación de films ultrafinos. En la última década, los thin films han atraído mucha atención debido a su posible aplicación en dispositivos de separación de interfases, sensores, ópticos y electrónicos.

Los nanotubos de carbono se pueden clasificar como nanotubos de pared única (SWNT) y nanotubos de paredes múltiples (MWNT). Los SWNT consisten en una lámina cilíndrica simple con un diámetro entre 1 y 3 nm y una longitud de varios micrómetros. Poseen una nanoestructura cilíndrica formada

enrollando una sola hoja de grafito en un tubo. Los MWNT consisten en una disposición coaxial de nanotubos simples concéntricos como anillos de un tronco de árbol separados entre sí por 0,34 nm. Los CNT son prometedores como sustancia de inmovilización debido a su importante resistencia mecánica, alta área de superficie, excelente conductividad eléctrica y buena estabilidad. Debido a una alta conductividad eléctrica y área de superficie, los nanotubos de carbono (CNT) no solo pueden maximizar el área de superficie específica de un nanocompuesto para la transferencia de electrones sino que también proporcionan un transporte de reactivos mejorado en masa.

Los óxidos metálicos de transición, como el  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , muestran un excelente rendimiento electrocatalítico hacia el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, su mala conductividad presenta bajas corrientes de detección en comparación con los metales nobles. Para superar este problema, es posible usar materiales conductores para preparar compuestos híbridos. El rGO actúa como una plantilla conductiva bidimensional (2D) para el ensamblaje de nanoestructuras 1D en redes conductivas tridimensionales (3D).

El cuadro 2.4 presenta algunos empleos de las nanoestructuras mixtas. Entre las nanoestructuras mixtas que se muestran en esta tabla, hay un predominio del grafeno nanoestructurado, donde SG (grafeno con baja densidad de defectos en su red) presenta la mayor sensibilidad seguida de CVDG (Grafeno con mayor cantidad de defectos) y luego por el rGO (óxido reducido de Grafeno). Como material soporte, el SG presenta una sensibilidad superior a los nanolambres de  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , el LOD del SG es realmente alto, lo cual es una característica no deseada. Los nanocompuestos a menudo ofrecen una alta sensibilidad, pero no pueden alcanzar un límite de detección interesante, como se muestra en la tabla 2.4, por lo que la elección de estas nanoestructuras mixtas debe basarse en un compromiso entre sensibilidad y límite de detección.

Cuadro 2.4: Sensores basados en nanoestructuras mixtas

Nanomaterial	Princ. de Transd.	Sensibilidad [ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	LR	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Ref
SG		$202 \times 10^3$	–	651.5	[103]
CVDG		173	–	15.1	[103]
rGO	Amp	25	–	9.2	[103]
MWCNT-PEDOT	Amp	943	0.1-9.8 mM	50	[104]
PPy/PB NWS	Amp	10	$2 \times 10^{-4}$ M to 7.2 mM	–	[49]
HNTs	Amp	0.98	4 $\mu\text{M}$ to 1064 $\mu\text{M}$	0.226	[44]
MWCNT-Fe:H <sub>2</sub> N-CHIT	Amp	0.8345	50 to 2500 $\mu\text{M}$	2.3	[105]

La polietilenimina (PEI) es un polímero soluble en agua con grupos amino. Debido a sus grupos amino expuestos, la PEI puede reaccionar con otros mate-

riales con algunos grupos activos determinados, como grupos carboxilo o epoxi. Shan et al. [106] aprovechó estos grupos activos para enlazar covalentemente hojas de grafeno a través de una reacción nucleofílica entre los grupos amino en la PEI y grupos epoxi del óxido de grafeno (Figura 2.3). El PEI/grafeno se encuentra cargado positivamente, por lo que los autores prepararon un film junto con PB utilizando la diferencia en la carga eléctrica. El sensor se construyó mediante un método de complejación capa por capa. Este método de construcción es preferible cuando se busca la simplicidad y los métodos de bajo costo. La operación del sensor resultante se muestra en la figura 2.4.

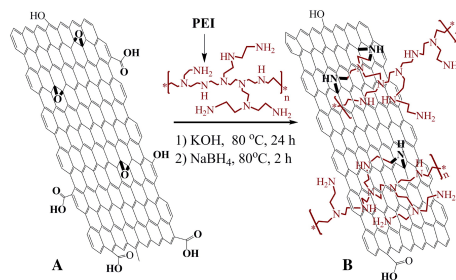


Figura 2.3: **A** Hoja de óxido de grafeno. **B** Grafeno funcionalizado con PEI. Este composite fue preparado primero agitando la PEI y el grafeno en KOH a 80°C durante 24 hs. Luego se agregó NaBH<sub>4</sub> a la mezcla y se mantuvo a 80°C durante 2 hs. El nanocomposite resultante se recolectó mediante centrifugación y se lavó con agua destilada.[106]

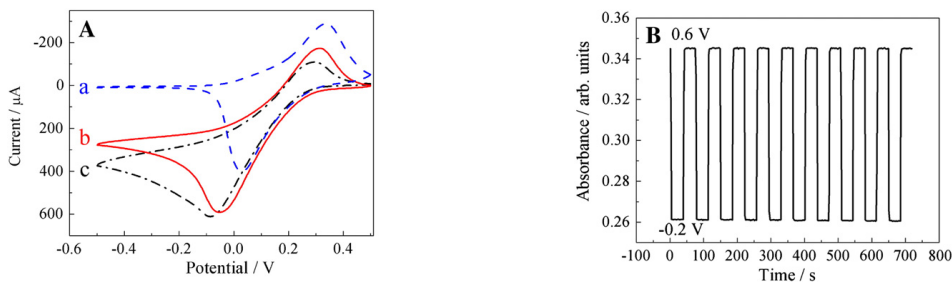


Figura 2.4: **(A)** Voltamogramas cíclicos del [PB/PEI-grafeno]<sub>10</sub> multicapa (a) en buffer pH=4, (b) multicapa de [PB/PEI-grafeno]<sub>10</sub> y (c) multicapa de [PB/PEI]<sub>10</sub> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM en buffer. La velocidad de barrido fue de 10 mV/s. **(B)** Monitoreo espectroscópico del cambio de potencial del film multicapas de [PB/PEI-grafeno]<sub>16</sub>. El cambio ocurrió entre los -0,2 V (PW) y 0,6 V (PB).[106]

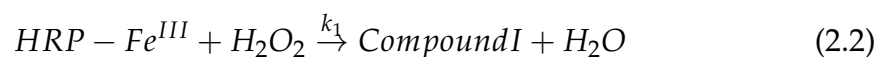
### 2.2.6. Biomoléculas

Los biosensores que emplean enzimas como elemento de reconocimiento biológico tienen muchas características favorables, como la selectividad y la sensibilidad. Otra característica importante es su versatilidad, por ejemplo los

biosensores basados en la peroxidasa se han empleado no solo para la detección de  $H_2O_2$  sino también para fenoles, compuestos aromáticos, etc. Sin embargo, cuando se inmovilizan enzimas o proteínas en sustratos sólidos, es importante mantener la electroactividad de esta proteína o enzima. La orientación desfavorable o la adsorción directa de biomoléculas en una superficie de un electrodo metálico puede reducir drásticamente su actividad catalítica. El rendimiento de un biosensor depende principalmente de las propiedades de la capa bioactiva asociada con el transductor. Aquí, cuando se describen a los biosensores de  $H_2O_2$  se trató también el paso de la inmovilización. Este paso es de suma importancia en la biodetección porque la molécula de biorreconocimiento debe conservar sus funciones como cuando estaban en su entorno natural. Hay tres generaciones de biosensores que involucran transferencia de electrones entre el elemento biológico (enzimas) y el electrodo. Muy resumido, un biosensor de primera generación se basa en mediadores naturales, por ejemplo, el oxígeno con la limitación de su dependencia en la concentración. El biosensor de segunda generación se basa en mediadores redox introducidos artificialmente, como el ferroceno. Los principales problemas con el último son el posible filtrado al medio y su toxicidad. El biosensor de tercera generación se obtiene cuando hay una transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo. Este es el mejor caso para biosensores pero es el más difícil de construir. Sin embargo, la llegada de la nanotecnología permitió el aumento exponencial en la investigación de biosensores de tercera generación [107].

Para los biosensores de tercera generación, la principal ventaja es la ausencia de mediadores, lo que les proporciona una selectividad y sensibilidad superiores. También la posibilidad de modular las propiedades deseadas de un dispositivo analítico usando la modificación de proteínas con técnicas de ingeniería genética o química.

La HRP es una glicoproteína de ca. 42 kDa y forma globular. El mecanismo de reducción bioelectrocatalítica directa del  $H_2O_2$  en el electrodo modificado con HRP podría representarse de la manera más simple de la siguiente manera:



No está dentro del alcance de este capítulo estudiar en detenimiento el mecanismo detrás de la interacción de HRP con el electrodo en presencia de  $H_2O_2$ .



Hay varios trabajos en los que la reacción de las enzimas peroxidadas se revisó más a fondo [108], [109]. A altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la reacción da como resultado un mayor estado de oxidación (+6), donde la enzima está inactiva. Este es un parámetro muy importante a tener en cuenta cuando se estudia el biosensor. Se propuso otro mecanismo electroquímico basado en la propiedad del HRP que puede actuar como reductor u oxidante [110] [111].

Cuando se habla de sensores, se podría enfocar en el mecanismo de detección, el principio de transducción y algunas de las características claves del sensor como sensibilidad, rango lineal, límite de detección. En particular, para los sensores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y similares también es importante establecer la polarización del electrodo. Cuanto mayor sea este potencial, mayor será la señal del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero esto también aumenta las posibilidades de detectar otras moléculas electroactivas. Un alto sobrepotencial de entre 0,5 y 1 V contribuye a la degradación del electrodo.

El cuadro 2.5 muestra algunas biomoléculas empleadas en la detección del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cuadro 2.5: Biosensores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> basados en biomoléculas

Nanomaterial	Princ. de Transd.	Sensibilidad [ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	LR	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Ref
AgNPs	CV	$3 \times 10^5$	0.05 - 20 $\mu\text{M}$	0.02	[112]
Hb/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pt	Amp.	$12 \times 10^3$	0.125 $\mu\text{M}$ -0.16 mM	0.03	[113]
ZnO NPs	CV	$6 \times 10^3$	20 - 350 $\mu\text{M}$	8	[114]
SDS-GNPs-GR	Amp.	$1.53 \times 10^3$	1.0-170 $\mu\text{M}$	0.012	[115]
GE/Poly-Tyr/AuNs	Amp.	992	0.05 - 19.35 mM	$0.98 \times 10^{-3}$	[116]
nanoporous Au	Amp.	666	$5 \times 10^{-8}$ - $2 \times 10^{-4}$ M	0.02	[117]
Au NPs BC nanofibers	Amp.	610	0.3 $\mu\text{M}$ -1 mM	0.1	[118]
nano-Pt-CHIT film	Amp.	561	$1.4 \times 10^{-7}$ - $6.6 \times 10^{-3}$ M	0.045	[119]
AgNL	CV	376.34	$3.85 \times 10^{-5}$ - $5.2 \times 10^{-4}$ M	0.13	[120]
HRP-MIL-100(Cr)-B/GCE	Amp.	339	0.5 $\mu\text{M}$ - 3 mM	0.1	[121]
Au NPs	Amp.	318	$2.1 \times 10^{-7}$ - $3.1 \times 10^{-3}$ M	0.07	[122]
TiO <sub>2</sub> NTs	Amp	208	5 $\mu\text{M}$ - 0.4 mM	2	[123]
DDAB/Hb/GCE	Amp.	105.4			[124]
Nf/Hb/FF-G/GCE	Amp.	56.61	0.5 - 500 $\mu\text{M}$	0.1	[125]
MgO NPs	CV	ca. 50	50-190 $\mu\text{M}$	-	[126]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GE	Amp.	25.4	1.50 - 585 $\mu\text{M}$	0.5	[127]
Hb/f-MWCNT-P-I-His-ZnO	Amp.	21.14	4 - 18,00 $\mu\text{M}$	0.01	[128]
HRP/PTMSPA@GNR	Amp	21	$1 \times 10^{-1}$ to 1 mM	0.06	[129]
carbon-coated iron NPs	Amp.	7.14	3.1 $\mu\text{M}$ -4 mM	1.2	[130]
CNN-CS-DMF-HRP	Amp.	7	0.99-18 $\mu\text{M}$	0.3	[131]
nanoporous CeO <sub>2</sub>	Amp.	5.4	3 mM	0.6	[132]
HA-SWCNT	Amp	2.87	5 $\mu\text{M}$ - 1 mM	1	[133]
4-NPDS-HRP	Amp.	2.6	5 - 50 $\mu\text{M}$	1	[134]
CNN-CS-DMF-Mb		1.43	2-480 $\mu\text{M}$	0.6	[131]
GNPs-TNTs	Amp.	0.81	5 $\mu\text{M}$ - 1 mM	2.1	[135]
CNN-CS-DMF-Hb		0.44	2-210 $\mu\text{M}$	0.6	[131]
CNN-CS-DMF-Cyt c		0.16	1.6-190 $\mu\text{M}$	4.7	[131]
ND-NS(HRP)	Amp	0.129	1 - 45 mM	59	[136]

El uso combinado de nanoestructuras (principalmente Ag, Au y Pt) con proteínas capaces de catalizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como HRP o Hb, puede dar lugar a grandes sensibilidades y mejores LOD.

Cuando se trabaja con biomoléculas, la construcción es de vital importancia para mantener su capacidad de realizar la tarea prevista. Por esta razón, Xu et al. [137] estudió la construcción de un biosensor de tercera generación mediante el autoensamblaje de nanopartículas de oro sobre nanoesferas de poliestireno-co-ácido acrílico (St-co-AA) funcionalizadas con tioles. Este electrodo se incubó luego en solución de HRP durante 10 horas a 4 °C para unir la enzima a las AuNPs. El biosensor amperométrico presentó un rango lineal entre 10.0  $\mu\text{M}$  a 7 mM con un límite de detección de 4.0  $\mu\text{M}$  con un potencial aplicado de -200 mV. Otro biosensor de tercera generación basado en HRP para  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue desarrollado por Ren et al. [138]. El biosensor se preparó inmovilizando HRP en un electrodo de oro modificado con AgNPs. La inmovilización se llevó a cabo sumergiendo primero el electrodo de oro en una solución de cisteamina-etanol, luego se inmovilizaron las nanopartículas de plata en la monocapa de cisteamina, y finalmente se adsorbió HRP en las superficies de las AgNPs. Este último paso donde las AgNPs fueron el lugar elegido para la biofuncionalización y no directamente sobre la capa de cisteamina es el punto interesante del artículo. Los autores utilizan las propiedades eléctricas de las AgNPs y las emplearon como centros de reducción para mejorar la conductividad entre el sustrato y la enzima. De acuerdo con este trabajo, las AgNPs permitieron la construcción del efecto túnel entre la HRP y el electrodo y, por lo tanto, este biosensor se comportó como un biosensor de tercera generación.

El atrapamiento es uno de los métodos para retener la molécula de biorreconocimiento en el transductor. Este método tiene la ventaja sobre la unión covalente de ser menos complicada y lleva menos tiempo. Lu et al. [139] estudió el uso de nanohilos de bromuro de óxido de antimonio (AOB) que contienen hidroxilos junto con quitosan para configurar un entorno amigable para el atrapamiento de enzimas. Además, el uso de esta técnica de inmovilización orgánica/inorgánica facilita la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo, lo que hace posible un biosensor de tercera generación. Con un objetivo similar al del atrapamiento, la tecnología Sol-gel (SG) es interesante en el campo de la inmovilización de una variedad de biomoléculas, debido a sus características especiales tales como ser químicamente inerte, rigidez física, alta estabilidad térmica y la biodegradación. Ha sido ampliamente utilizado para la fijación o encapsulación eficiente de biocatalizadores en la superficie del electrodo. Debido a su buena capacidad de biocompatibilidad y formación de películas, la estabilidad de estos biosensores puede mejorarse en gran medida. Sin embargo, estos biosensores basados en HRP requieren mediadores para transferir

electrones entre el electrodo y la enzima. En su trabajo, Wang et al. [140] preparó un biosensor de  $H_2O_2$  sintetizando una película de sílice sobre un electrodo modificado con CNT donde se inmovilizó HRP. Otro grupo desarrolló una estructura basada en la combinación de metodología de sono - catálisis y el uso de granos de carbono [141]. En este trabajo, ElKaoutit et al. evaluó un biosensor de tercera generación basado en HRP. Para construir dicho biosensor, la mezcla de detección se preparó con la polimerización de HRP/glutaraldehído/Nafion en un baño ultrasónico. Esta solución se depositó sobre el electrodo de sonogel-carbono. La detección de  $H_2O_2$  se realizó aplicando  $-250$  mV al electrodo de trabajo y midiendo los cambios en la corriente. Wu et al. [142] preparó films de (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (3-MPT) mediante autoensamblado acoplado con el método de enlace. Aquí se puede fabricar un biosensor de tercera generación para  $H_2O_2$  debido a la red 3-MPT densamente empaquetada y de estructura 3D que proporciona un microambiente biocompatible para la inmovilización de HRP y una distancia de transferencia de electrones adecuada entre el centro electroactivo de HRP y la superficie del electrodo.

La fabricación de un biosensor de tercera generación a través de la tecnología de autoensamblaje es un enfoque atractivo debido a su simplicidad y versatilidad en la modificación de superficies. También existe la posibilidad de combinar tecnologías de electropolimerización y autoensamblaje para preparar biosensores. Gao et al. estudió la electroquímica directa de la Hb y su actividad catalítica hacia el  $H_2O_2$ . Se electropolimerizaron *p*-aminobenceno ácido sulfónico (*p*-ABSA) para obtener una película de poli(*p*-ABSA) cargada negativamente para inmovilizar *l*-cisteína (*l*-cys). Luego, se ensambló nano-Au en el electrodo modificado en base a la alta afinidad del mercapto (-SH) de la *l*-cys al nano-Au. La Hb se adsorbió en el electrodo de disco de platino modificado con el film de nano-Au/*l*-cys/poli(*p*-ABSA). En resumen, la modificación del electrodo consiste en la combinación de técnicas de electropolimerización y autoensamblaje. El rango lineal fue de  $2.1 \times 10^{-7}$  a  $3.1 \times 10^{-3}$  mol / L con un límite de detección de  $7.0 \times 10^{-8}$  mol / L ( $S / N = 3$ ) con un potencial aplicado de 30 mV [122]. De manera similar, Yang modificó un disco de platino al agregar una película compuesta de hemoglobina (Hb)/coloide de oro (nano-Au)/*l*-cisteína (*l*-cys)/nano-Au/nanopartículas Pt (nano-Pt)-chitosan (Chit). Nano-Pt-Chit se empleó como la matriz de inmovilización. Dado que la Hb se adsorbió en los AuNP, estos se usaron como centros de inmovilización y conducción. El rango lineal para la determinación de  $H_2O_2$  es  $1.4 \times 10^{-7}$  a  $6.6 \times 10^{-3}$  mol / L con un límite de detección de  $4.5 \times 10^{-8}$  mol / L ( $S / N = 3$ ) y un voltaje de polarización

de 30 mV [119].

Es bien sabido que usar HRP podría ser costoso e inestable especialmente cuando se inmoviliza sobre las superficies de los electrodos. Por lo tanto, existe un gran interés en encontrar alternativas para reducir el costo y mejorar el rendimiento de los biosensores de  $H_2O_2$ . La hemoglobina (Hb) es una proteína redox con una masa molar de aproximadamente 67 kDa que se encuentra en las células de sangre roja. Esta enzima ofrece la capacidad de reducir diferentes objetivos, como  $H_2O_2$ , nitrito y bromato. Vilian et al., Informaron un biosensor que consiste en una película compuesta de f-MWCNT-P-I-His-ZnO, donde la Hb fue lanzada e inmovilizada por una capa de Nafion [128] (Figura 2.5). Las modificaciones empleadas en este trabajo permitieron la transferencia directa de electrones entre la Hb y el electrodo.

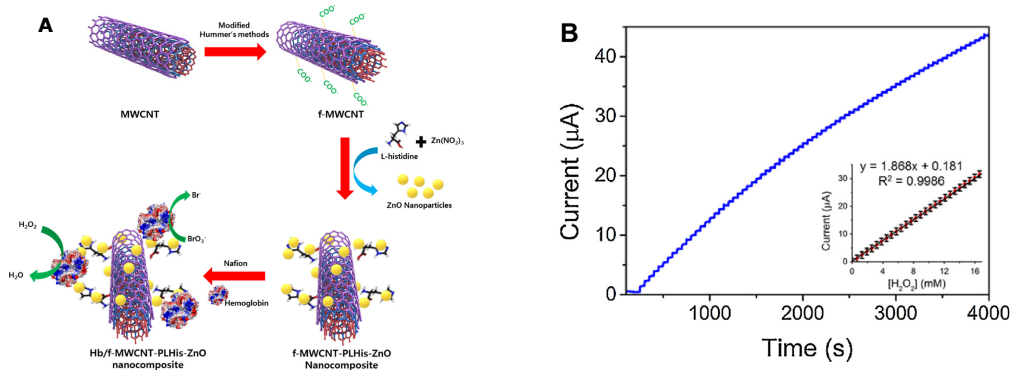


Figura 2.5: **A** Representación esquemática de la preparación del biosensor de bromato y  $H_2O_2$ . **B** Respuesta amperométrica del electrodo giratorio para cada adición sucesiva de  $H_2O_2$  (condiciones: -0,25 V, PBS pH 7, velocidad de rotación 1200 rpm). Recuadro: cambio de la corriente en función de la concentración de  $H_2O_2$ . [128]

### 2.3. Nanoestructuras para sensores de bioafinidad

El análisis clínico inmunológico clásico se basa en métodos cromatográficos, como el Ensayo inmunesorbente ligado a enzimas (ELISA) [143] [144], Dot blot [145], Western blot [146] [147], etc. Estas técnicas son costosas, lentas, requieren personal capacitado y no conducen a la miniaturización y la portabilidad. Los biosensores se desarrollaron como una alternativa a esos métodos clásicos. Brevemente, un biosensor convierte el proceso biológico de interés en una señal detectable. Desde el punto de vista de la transducción, los tipos principales de biosensores pueden ser: electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos. Según la clasificación de Perumal et al., desde el punto de vista del transductor del

biosensor [148], los biosensores electroquímicos pueden ser: A) amperométrico, donde la señal medida es la corriente producida por la especie electroactiva y es proporcional a la concentración del analito [149]. B) Potenciométricos, son electrodos selectivos de iones donde la transducción se realiza por la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (WE) y el electrodo de referencia (RE) con un flujo de corriente despreciable [150] [151], C) Los biosensores basados en EIS realizan la detección aplicando un pequeño voltaje de CA y barriendo en frecuencia. Es aconsejable que el lector busque una revisión elaborada por Prodromidis [152]. Aquí, el autor describe los antecedentes teóricos, los diferentes biosensores y los instrumentos empleados para las mediciones. Entre los biosensores ópticos podemos encontrar: A) la resonancia de plasmón de superficie (SPR) que emplea ondas electromagnéticas en la superficie del transductor para detectar el analito [153] [154] [155]. B) Quimioluminiscencia y fluorescencia: el primer método emplea la emisión de luz de una reacción química entre el analito objetivo y el elemento de biorreconocimiento [156]. La fluorescencia necesita una fuente de luz externa para producir emisiones a una determinada longitud de onda. Esta última técnica ha sido ampliamente utilizada para immunosensing [157]. Los biosensores piezoeléctricos se basan en la capacidad de algunos cristales para cambiar su tamaño cuando se aplica una determinada tensión o para generar tensión si están deformados. Cada cristal resuena a una frecuencia natural, y esto se puede controlar aplicando un voltaje. En este caso, el elemento de bioreconocimiento está unido a la superficie. Cuando el analito objetivo interactúa con la superficie, cambia la frecuencia de resonancia y, por lo tanto, genera la señal de transducción. El más estudiado de estos biosensores es la microbalanza de cristal de cuarzo [158].

Desde el punto de vista del elemento de biorreconocimiento, la mayoría de los biosensores podrían clasificarse como enzimáticos o basados en afinidad. En general, los biosensores enzimáticos miden la interacción entre la enzima y el sustrato. La mayoría de las veces la señal medida aumenta cuando aumenta la concentración de analito. Los biosensores de glucosa y  $H_2O_2$  son muy buenos ejemplos [108] [159]. Por otro lado, también es posible relacionar la inhibición de una enzima con la concentración del analito. La principal aplicación para esto, es la medición de drogas o contaminantes [160]. Los biosensores basados en afinidad incluyen anticuerpos (Abs) [161], DNA [162], aptámeros (oligonucleótido sintético o péptido que imitan a un anticuerpo) [163] y fagos (receptores sintéticos o naturales) [164] como elementos de biorreconocimiento. Estos biosensores son capaces de detectar la interacción entre el biosensor y el ana-

lito objetivo. Estas interacciones son en su mayoría vinculantes no covalentes [165]. Se desarrollaron diferentes transductores para inmunosensores: microbalanza de cristal de cuarzo [166], resonancia de plasmón superficial (SPR) [167], fluorescencia de onda evanescente [168]; detección electroquímica que cubre la amperometría [169], impedimetric [152].

Los anticuerpos son proteínas en forma de Y con un diámetro promedio de 10-15 nm. Se producen en respuesta a antígenos (Ags.), como toxinas, productos químicos, virus, toxinas bacterianas y otras sustancias extrañas. De esa manera el anticuerpo tiene dos funciones principales: reconocimiento de sustancias y desencadenar eventos para eliminarlas. Los anticuerpos constan de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. El sitio de reconocimiento está compuesto por la porción terminal de la mitad de la liviana y la mitad de la cadena pesada. Esto se llama fragmento Fab y es variable. La parte C-terminal de la cadena pesada (región constante) se llama Fc. Esta última parte juega la función efectora, es decir, determina el mecanismo para destruir Ags. [170].

Se pueden usar diferentes nanoestructuras, incluidos nanotubos (NT), nanoalambres (NW), nanorods (NR), nanoesferas (NS), puntos cuánticos (QD), nanopores (NPos), nanopartículas (NP) y materiales nanocompuestos (NCM). para cuantificar biomoléculas. Se considera un material *nano* cuando sus elementos estructurales tienen una dimensión inferior a  $100 \times 10^{-9} \text{m}$  [171] [172] [173]. Estos materiales pueden ser de origen orgánico o inorgánico. Algunas estructuras como NPs [174] y QDs [175] se usan como etiquetas para mejorar la señal. Por otro lado, a menudo se emplean NT, NW y otros para modificar la superficie del transductor. Mientras que siempre se busca la amplificación de la señal, la modificación de la superficie por nanoestructuras también busca la mejora de la etapa de inmovilización.

Las características ventajosas de los materiales nanoestructurados incluyen biocompatibilidad, gran superficie específica, estabilidad química y térmica, actividad electrocatalítica y buena conducción de electrones. El desarrollo y la caracterización de las nanoestructuras están más allá del alcance de este capítulo. Sin embargo, se puede encontrar una caracterización más extensa en diferentes publicaciones [176] [177] [178] [179] [180].

Existe un gran interés en el desarrollo de sensores sin etiquetas, que prometen mejoras en la selectividad, especificidad, menor costo y detecciones en línea [181]. La detección directa sin etiquetas de un analito se puede lograr monitoreando el cambio en la conductancia o propiedades relacionadas de un semiconductor debido a la acumulación o agotamiento de carga del portador dentro

del semiconductor de la interacción analito - semiconductor. Los sensores basados en transistores de efecto de campo (FET) son atractivos debido a su bajo consumo de energía, bajo costo, miniaturización y capacidad de multiplexación. Como ejemplo de detección sin etiquetas, Nidzworski et.al. presenta un inmuno sensor universal para la detección del virus de la influenza A. La detección del virus fue posible mediante la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y la unión directa de anticuerpos al electrodo de oro. En este artículo, la curva de calibración se obtuvo representando el cambio en la resistencia a la transferencia de carga frente a la concentración de proteína. Es importante señalar que las diferencias inferiores al 5% en la resistencia fueron rechazadas [182]. Otro biosensor sin etiquetas fue desarrollado por Sharma et.al. para detectar la interleucina-8 humana (IL-8). La fabricación del biosensor se llevó a cabo empleando una proteína de captura no anticuerpo sintética pequeña y robusta basada en un armazón de cistatina que muestra una alta afinidad por la IL-8 humana (figura 2.6). Un punto interesante en este documento es el diagrama de calibración. Aquí los autores eligieron el componente de fase a una frecuencia fija para mostrar la respuesta del biosensor a la concentración de IL-8 [183].

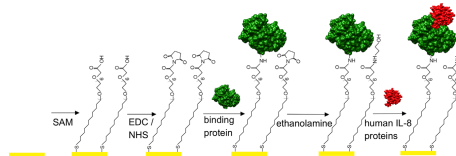


Figura 2.6: Esquema del ensamblado del biosensor. Una SAM formada con monotioloalcano-PEG primero se depositó sobre un electrodo de oro. El elemento de biorreconocimiento se inmovilizó covalentemente sobre la SAM cuando los grupos funcionales de ella, el ácido carboxílico, se activaron usando EDC/NHS. EL bloque de los sitios activos remanentes se hizo con etanolamina. En sensor se probó usando fluidos con el contenido de la proteína humana IL-8. La detección se hizo con EIS.[183]

La EIS es una técnica muy poderosa como método de transducción para biosensores sin etiquetas. Al medir el espectro de impedancia, es posible extraer, con simples cálculos, un rango de parámetros (R, C, fase, etc.) que describen la respuesta del biosensor.

Hay revisiones que abordan el empleo de los diferentes biosensores [184] [185] [186]. Este capítulo pretende obtener una visión general de los nanomateriales, moléculas, polímeros, electrodos y los métodos de transducción utilizados en dispositivos de detección inmunológica.

### 2.3.1. Nanoestructuras metálicas

En esta sección, presentamos el uso de diferentes nanoestructuras metálicas como dispositivos de soporte y transducción de inmovilización.

En 1997, Tiefenauer et al. informaron sobre un sistema inmunosensor amperométrico multivalente que se basa en tecnología de silicio y nanohilos de oro (AuNWs). El antígeno marcado con biotina se unió a la superficie del electrodo a través del enlace estreptavidina-biotina. Los anticuerpos marcados con ferroceno produjeron la señal de detección electroquímica en AuNWs [187].

Koh et al. desarrollaron un inmunosensor electroquímico sensible a las proteínas, basado en un electrodo de alambre de platino modificado con alúmina nanoporosa. El mecanismo de detección depende del bloqueo de los canales de poro cuando las moléculas de antígeno proteico se unen al anticuerpo unido a las paredes del canal, impidiendo la difusión de la sonda redox, ferrocenometanol, hacia el alambre de platino sensible superpuesto por la película de alúmina nanoporosa [188].

Siguiendo el mismo concepto de método de transducción como Koh, Zhuo et al. describió un inmunosensor amperométrico. Utilizaron positivamente nanopartículas cargadas de oro (PGN) y un material nanoestructurado compuesto de ferrocenomonocarboxílico (FceCOOH) y dianhídrido 3,4,9,10 - perilentetra-carboxílico (PTCDA). Si bien la fabricación del electrodo puede ser complicada, la cuantificación del analito es simple. La detección se basa en el cambio en la respuesta de la corriente antes y después de la reacción antígeno-anticuerpo. Tal complejo inhibe el acceso de la sonda redox al electrodo. Entonces, la respuesta es la diferencia en la corriente antes y después. En este artículo en particular, los autores no solo caracterizaron el electrodo utilizando técnicas físicas como la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) y el microscopio electrónico de barrido (SEM), sino también las técnicas de EIS y CV dadas las características de un buen electrodo [189].

La combinación de PB y AuNPs como plataforma transductora fue investigada por Chen et al. Aquí, las PBNPs se prepararon con la ayuda de un polímero que suprime el crecimiento de cristales de PB. Luego se agregó chitosan a la mezcla de NPs. Las AuNPs se unieron mediante interacciones electrostáticas con la mezcla de PBNPs. Como de costumbre, se emplearon AuNPs debido a su alta relación superficie / volumen y la mejora de la transferencia de carga. Es notable la simplicidad de la fabricación del biosensor. El electrodo se modificó con nanoestructuras mediante el agregado a gotas del material y la biofuncio-



nalización con el Ab se obtuvo por inmersión [190].

Continuando con los sensores basados en AuNPs y PB, Huang et al. desarrolló un inmunosensor electroquímico de salbutamol (SAL). En esta oportunidad, el antígeno, SAL, se inmovilizó en la superficie del electrodo. Antes de la inmovilización del SAL, un GCE se modificó con AuNPs, PB y un polímero en la parte superior donde se unió el SAL. Se inmovilizó un anticuerpo secundario anti-SAL marcado con HRP (AAb) en un nanocompuesto de quitosan - grafeno - AuNPs. La detección sigue una reacción del tipo competencia. Con el aumento de SAL, la señal muestra una disminución. La explicación de esto es que, cuanto más libre esté la solución de SAL, menor será el AAb que se une al Ab anti-SAL unido a la superficie del electrodo [191]. Este biosensor mostró un buen rendimiento en comparación con otros métodos de detección de salbutamol. Sin embargo, si comparamos el método de fabricación como el descrito anteriormente, este biosensor es mucho más complicado. Lo mismo podría decirse con respecto a la reacción de tipo competitivo como estrategia de detección.

Etiquetar un anticuerpo secundario ( $Ab_2$ ) es un método comúnmente utilizado como señal de detección. Las técnicas de transducción podrían ser ópticas o electroquímicas. Zhang et al. empleó una película de PPY con nanoclusters Au como electrodo donde se inmovilizó el Ab primario. Se usaron nanorods de Au, funcionalizados con HRP y el  $Ab_2$  marcado con HRP, como el amplificador de señal (Figura 2.7) [192].

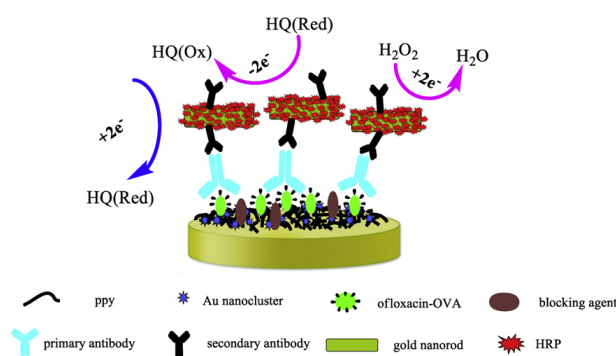


Figura 2.7: Representación esquemática del inmunosensor electroquímico [192].

Los puntos cuánticos (QD) son nanocristales con diámetros en el rango de 2 a 10 nm. Debido a su pequeño tamaño, los electrones en los puntos cuánticos están confinados y, como resultado, hay una cuantificación de los niveles de energía. El resultado más evidente de esto es la fluorescencia, en donde los nanocristales pueden producir colores distintivos determinados por el tamaño de las partículas. Chen et al. desarrolló una sonda (CdSe QDs) para inmunoen-

sayo de electroquimioluminiscencia (ECL). En general, la señal de la ECL con QDs es menor que la obtenida de otros indicadores. Aquí, los autores diseñaron una estrategia para mejorar la señal de ECL cargando QDs sobre AuNPs. Para este propósito, AuNPs se funcionalizaron con dendrímeros poliamidoamina (PAMAM). [193].

### 2.3.2. Nanoestructuras de óxidos metálicos

Las estructuras de óxido metálico, como el  $\text{SiO}_2$ , son bien conocidas por su estabilidad y aplicaciones biomédicas. Con el auge de las nanoestructuras, el impacto en la salud humana y el medio ambiente de tales estructuras y materiales es de gran interés. Al respecto existen algunos trabajos muy interesantes, [194], [195], [196], [197].

Las nanopartículas magnéticas han atraído mucho interés debido a la posibilidad de guiarlas a sitios específicos mediante campos magnéticos externos [198]. A pesar de esta ventaja, las NP magnéticas tienden a agregarse cuando se colocan en condiciones *in-vivo* [199].

Gong et al. estudió una estrategia que combina nanopartículas de plata y  $\text{SiO}_2$  para desarrollar una nanopartícula núcleo-capa incrustada con un colorante, el isotiocianato de rodamina B, como etiqueta para Raman. Considerando lo anterior, las NP magnéticas se recubrieron con  $\text{SiO}_2$  y se usaron como herramientas de inmovilización y separación (Figura 2.8). Aquí se encuentra el mejor punto de este enfoque, la estabilidad de las NPs de  $\text{SiO}_2$  y la practicidad de usar NPs magnéticas [200].

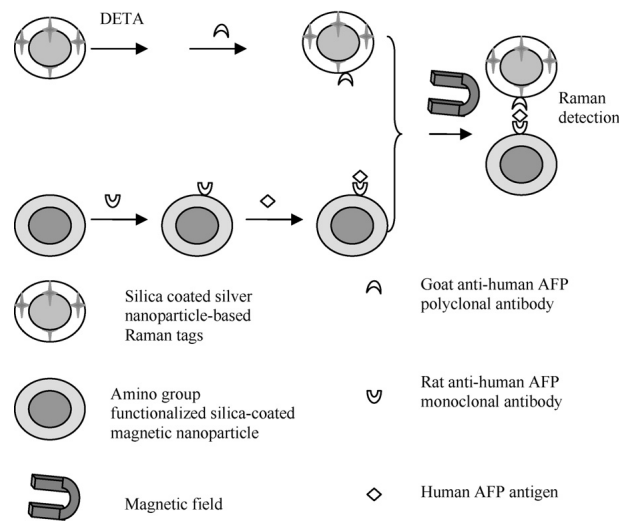


Figura 2.8: Diagrama de un inmunoensayo tipo sandwich que utiliza nanopartículas de Ag/SiO<sub>2</sub> del tipo núcleo-capa usadas como marcador. La matriz de inmovilización son nanopartículas magnéticas cubiertas con de SiO<sub>2</sub> [200].

Como se mencionó anteriormente, las propiedades ópticas de las NP dependen del tamaño. Un efecto es la aparición de la fotoluminiscencia (PL) a temperatura ambiente. Esto fue empleado por Viter et al. para desarrollar un inmunosensor basado en el cambio del espectro de fotoluminiscencia al interaccionar el antígeno con el anticuerpo [201].

Otra propiedad importante de las NP es su capacidad redox. Algunas NP como el óxido de plata y plata (Ag-Ag<sub>2</sub>O NP) presentan picos redox cuando se realiza un barrido de potencial. Yang et al. desarrolló un inmunosensor electroquímico sin etiquetas usando Ag-Ag<sub>2</sub>O NP y grafeno sobre un electrodo de oro (Figura 2.9). Un enfoque eficiente considerando que las NP se emplearon como matriz de inmovilización y transductor de señal. Al aumentar las concentraciones de Ag, hay un aumento en la respuesta actual [202].

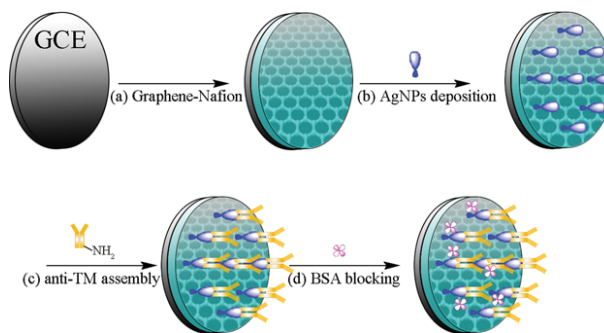


Figura 2.9: Representación esquemática del inmunosensor [202].

En un enfoque completamente diferente del uso de MNP, Tian et al. diseñó un inmunoensayo para el virus Zika. El analito objetivo era un oligonucleóti-

do de virus sintético y la cuantificación se llevó a cabo por susceptometría de corriente alterna. Brevemente, los MNP funcionalizados con estreptavidina, cebadores biotinilados y la muestra se mezclan con los reactivos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) en los que se amplifica el oligonucleótido del Zika. Los amplicones resultantes están unidos a los MNP, lo que permite la detección (Figura 2.10) [203]. Si miramos más allá de todas las dificultades que implican los métodos de biología molecular, encontramos una técnica creativa para detectar el virus del Zika. Hay una ventana de 7 días (después de los primeros síntomas) para realizar las pruebas de laboratorio estándar. En promedio, estas pruebas tienen un tiempo de ejecución de ca. 90 minutos. Combinando LAMP con susceptometría, este grupo logró un LOD y tiempo de ensayo más bajos en comparación con los ensayos estándar.

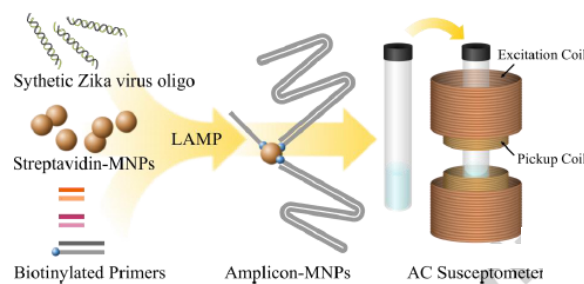


Figura 2.10: Ensayo de LAMP que utiliza susceptometría magnética [203].

Sanguino et al. depositó nanopilares (NR) de ZnO usando un método hidrotérmico sobre un microelectrodo interdigitado en oro (IDE) para desarrollar un inmunosensor electroquímico sin marcadores (Figura 2.11). El método de detección de impedancia no es efectivo cuando se usan IDE micrométricos debido a los efectos del tamaño del electrodo. Una posibilidad de aumentar la sensibilidad es usar electrodos nanométricos, lo cual es costoso y lento. Aquí, la solución encontrada vino de dos lugares: primero, el electrodo se fabricó en un tamaño micrométrico con ZnO NRs para aumentar el área superficial. Segundo, en lugar de medir la impedancia, los cambios se detectaron usando la capacitancia y la fase en función de la frecuencia [204].

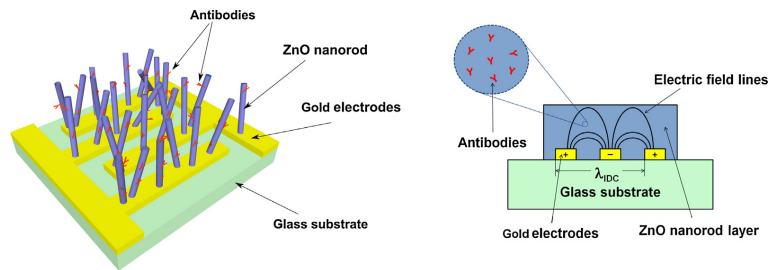


Figura 2.11: La capa de nanocolumnas de ZnO se utilizan para inmovilizar y distribuir los anticuerpos sobre la región activa del biosensor, donde la medición se hace mediante un campo eléctrico [204].

Los films delgados no solo ofrecen la promesa de que los sensores sean cada vez más pequeños, sino que también sus materiales y recubrimientos los hacen adecuados para biosensores implantables. Existe una gran variedad de materiales, estructura, métodos de fabricación y técnicas de detección de películas delgadas que exceden el alcance de este capítulo. Sin embargo, la intención aquí es dar una idea de esta tecnología.

Ansari et al. depositó una película de óxido de zinc nanoestructurado (Nano-ZnO) en una placa de vidrio con óxido de indio-estaño (ITO) para coinmovilizar anticuerpos de inmunoglobulina de conejo (r-IgG) y albúmina de suero bovino (BSA) para la detección de ocratoxina-A (OTA). La inmovilización de r-IgG se llevó a cabo mediante la dispersión de 10 $\mu$ l de solución en el electrodo de Nano-ZnO/ITO derivado del sol-gel (figura 2.12) [205].

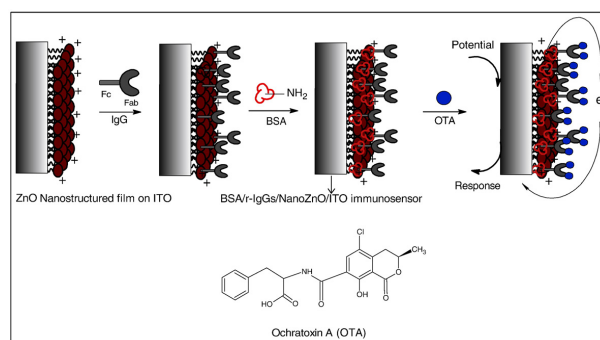


Figura 2.12: Esquema de la fabricación del inmunosensor cuya estructura es: BSA/r-IgGs/Nano-ZnO/ITO. También se muestra la reacción bioquímica entre la OTA y el inmunosensor [205].

Recientemente Munje et al. investigó el uso de películas delgadas de ZnO para aplicaciones de inmunosensado. El análisis de este trabajo se centró en el crecimiento y la funcionalización de las películas delgadas. La Figura 2.13 muestra las dos superficies funcionalizadas obtenidas al cambiar algunos parámetros

de crecimiento. El rendimiento del biosensor se analizó mediante EIS con un LOD de 10 fg/ml [206]. No muchos documentos mencionan las propiedades de fabricación del transductor y cómo influye en el biosensor. Aquí, los autores estudiaron la relación entre la superficie de la película delgada resultante con los enlazadores utilizados para inmovilizar el anticuerpo. Los resultados obtenidos con EIS mostraron la afinidad de los enlazadores hacia la diferente terminación de la superficie del ZnO. Esto también fue confirmado por fluorescencia.

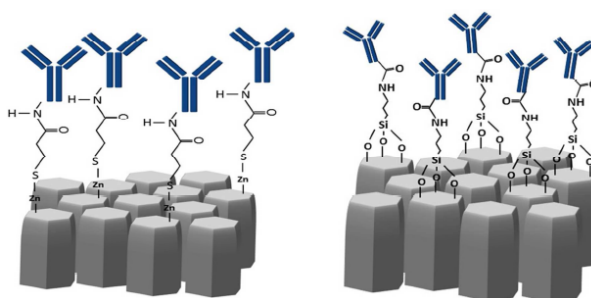


Figura 2.13: Set-up del inmunoensayo sobre una superficie de ZnO donde se usaron DSP y APTES para inmovilizar sobre la superficie anticuerpos anti-troponin-T. [206].

## 2.4. Conclusiones

Este capítulo, se centró en la relevancia de diferentes nanoestructuras, biomoléculas y métodos de transducción e inmovilización del elemento de bio-reconocimiento para la detección de  $H_2O_2$  como así también de antígenos. La incorporación de nanomateriales al transductor produce un efecto de sinergia y permite la posibilidad de detectar concentraciones más bajas de una amplia variedad de analitos.

Dentro de este trabajo, no intentamos cubrir toda la literatura en este campo de investigación. Este trabajo ofrece una revisión bibliográfica sobre diferentes nanoestructuras, conceptos de diseño, métodos de transducción y rendimiento de detección. A partir de nuestro examen del trabajo publicado en este campo, es evidente que el método de transducción más empleado es el electroquímico, en particular, la amperometría. Cuando se trabaja con este último, es importante considerar el voltaje de polarización para evitar interferencias y preservar la superficie del electrodo. Un material es capaz de catalizar  $H_2O_2$  a 0V es el azul de Prusia. Las nanopartículas, metálicas y de óxido de metal, también proporcionan una buena plataforma de detección, que proporciona una sensibilidad alta y un LOD cercano a un nivel inferior al micromolar. Al elegir la estructura para

la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es importante considerar el propósito de la medición.

El estudio del estado del arte de la tecnología en sensores y biosensores permitió analizar y evaluar las técnicas de fabricación y transducción empleadas en esta tesis.

## Capítulo 3

# Biosensor de Glucosa basado en nanoestructuras de ZnO

*Limitar nuestra atención a cuestiones terrestres sería limitar el espíritu humano. El mayor enemigo del conocimiento no es la ignorancia, sino la ilusión del conocimiento.*

Stephen Hawking



### 3.1. Introducción

El sensor amperométrico de glucosa es uno de los biosensores basados en enzimas más importantes. Los aspectos fundamentales de un sensor electroquímico de glucosa implican la inmovilización de una enzima sobre la superficie de un electrodo y la formación de una comunicación eléctrica eficaz entre la enzima y el transductor electroquímico, manteniendo (o incluso mejorando) la estabilidad mecánica y la actividad biocatalítica de la enzima. Para lograr este objetivo, una forma prometedora es el empleo de materiales nanoestructurados, por lo que se han desarrollado numerosas propuestas en las últimas décadas. Por ejemplo, se estudió ampliamente el uso de nanotubos de carbono para la inmovilización de enzimas, ya sea en forma aleatoria [207] [208] [209], o en una forma ordenada [210] para el diseño de biosensores. Además, se obtuvieron mejoras en el rendimiento de los sensores mediante la incorporación de enzimas redox con nanopartículas metálicas [211] y nanomateriales semiconductores [212]. Las grandes áreas inherentes a los nanomateriales permiten una carga más alta de enzimas, lo que mejora dramáticamente la actividad del sensor. Además, los nanomateriales se pueden utilizar para incorporar las enzimas dentro de su medio ambiente local a una nano- y microescala, mejorando así la transferencia de electrones entre los sitios activos de las enzimas y el electrodo [213]. Entre los diversos nanomateriales, el óxido de zinc (ZnO) ha atraído mucha atención debido a su gran cantidad de aplicaciones posibles. El ZnO es un semiconductor con una banda prohibida ancha (3,37 eV) y juega un papel importante en la óptica, optoelectrónica, y para la fabricación de sensores y actuadores debido a sus propiedades semiconductoras, piezoeléctricas y piroeléctricas [209]. El ZnO nanoestructurado, no sólo posee una alta área superficial, no es tóxico y presenta buena biocompatibilidad y estabilidad química, sino que también muestra características biomiméticas y una alta capacidad de intercambio de electrones [213], lo que es ideal para su aplicación en biosensores. Se pueden fabricar diferentes tipos de nanoestructuras de ZnO por medio de diferentes técnicas. En la bibliografía se reportaron en los últimos años, numerosas aplicaciones con distintas nanoestructuras sobre las que se inmovilizaron enzimas para la fabricación de biosensores, ya que el ZnO representa un excelente material con un punto isoeléctrico alto (de 9.5) que permite la fácil inmovilización de una enzima (con un punto isoeléctrico bajo) a través de una interacción electrostática [214]. En este trabajo se muestra el diseño de un biosensor de glucosa que permite la cuantificación de concentraciones muy bajas de glucosa empleando una

cantidad mucho menor de enzima y con mejor sensibilidad debido al empleo de nano partículas de óxido de zinc (ZnO NPs) en la superficie de un biosensor de pasta de carbón, a diferencia de la inmovilización en volumen comúnmente empleada en este tipo de sensores. Con esta metodología de inmovilización se abre la posibilidad de biosensores descartables, sensibles y de bajo costo.

## 3.2. Materiales y Método

### 3.2.1. Nanopartículas

La suspensión coloidal de NPs en alcohol isopropílico se obtuvo utilizando el método de Bahnemann et al. [215]. Para caracterizar la suspensión se midieron algunos parámetros químicos como ser el pH, la viscosidad, densidad, potencial zeta y conductividad. Para esto se utilizó un pHmetro Metler Toledo modelo MA 235, un viscosímetro Anton modelo Stabinger, un Nano Zeta Sizer marca Malvern, modelo Zen3600 y un conductímetro Metler Toledo modelo MC 226 con celda de cuatro electrodos

La síntesis de las nanopartículas se encuentra detallado en el trabajo de Sandoval et.al. [216]. Sus propiedades fisicoquímicas, medidas en el mismo medio en el que fueron sintetizadas (2-propanol), se muestran en la tabla a continuación.

Cuadro 3.1: Características físico-químicas de las ZnO NPs

Análisis	Resultado	Temperatura (°C)
pH	$6.125 \pm 0.002$	$25.0 \pm 0.5$
Viscosidad	$1.91 \pm 0.01$ poise	$23.0 \pm 0.5$
Densidad	$0.7893 \pm 0.0005$ gr/cm <sup>3</sup>	$24.5 \pm 0.5$
Potencial zeta	$18.0 \pm 0.1$ mV	$25.0 \pm 0.5$
Conductividad	$3.93 \pm 0.01$ $\mu$ S/cm	$26.1 \pm 0.5$

Para estimar el tamaño de las partículas de ZnO de la suspensión coloidal, se depositó una gota de 5  $\mu$ l de la suspensión sobre un sustrato de Si, se dejó secar el solvente a temperatura ambiente y se estudió la muestra mediante microscopía electrónica de barrido. El tamaño de las nanopartículas de ZnO se estimó en 5 nm y se corroboró a partir de medidas de absorbancia de las suspensiones coloidales utilizando un espectrofotómetro marca Varian Cary 50 UV/Visible [216].

### 3.2.2. Preparación del biosensor

El biosensor se prepara a partir de 2.4 mg de la enzima glucosa oxidasa (GOx) tipo VII de *Aspergillus niger* 100 unidades  $g^{-1}$  (Sigma Aldrich), que se disuelven en 1 ml de buffer fosfato de sodio y potasio (PBS) a pH 7 con 0.1 M de cloruro de potasio como electrolito soporte. La pasta de carbón (CP) se prepara con 171 mg de polvo fino de grafito (Sigma Aldrich) y 71 mg de parafina líquida (Laboratorio Palmares) en un mortero de ágata. Esta pasta se coloca luego sobre un disco de cobre dentro de un tubo de silicona, se compacta y se pule suavemente en papel vegetal (figura 3.1). El tubo de silicona sirve para brindar el soporte necesario al biosensor. El electrodo de cobre, de 3 mm de diámetro, se pule con lijas de granulado 600, 1000 y 2000 y luego se lava en 2-propanol y agua (1:1 v/v) dentro de un lavador ultrasónico durante 5 minutos. La CP y el contacto de cobre sirven como medio conductor para registrar los cambios de impedancia en la interfaz electrodo – electrolito.

El biosensor se polarizó con una suma de señales, compuesta por una continua (DC) de 900 mV y una señal alterna (AC) de 50 mV RMS y 0.4 Hz. Los valores óptimos para la señal de medición fueron obtenidos en trabajos anteriores [217]. Para estimular al sistema se realizaron agregados sucesivos de glucosa en concentraciones crecientes entre 0 y 4 mM y se midió la impedancia de interfase compleja (módulo  $|Z|$  y fase  $\Phi$ ). Se construyeron las curvas dosis-respuesta acumulativas, a partir de las cuales se extrajeron los valores de amplitud correspondientes a cada concentración de glucosa. Para las mediciones se empleó buffer fosfato (PBS) pH 7 con 0.1 M de cloruro de potasio.

#### 3.2.2.1. Inmovilización de la enzima

La inmovilización se realiza en dos etapas. Se emplea una solución que contiene solamente GOx como control, denominada solución A en concentración de 2,4 mg/ml. Por otro lado, se permite la interacción de la GOx con las nanoestructuras por medio de una solución de enzima (de la misma concentración que la solución A) con las nanopartículas, denominada solución B, que se deja reposar durante 24 hs a 4 °C. A continuación se depositan 5  $\mu$ l de la solución A sobre un electrodo y se deja secar. A continuación se agregan 5  $\mu$ l Nafion (Sigma Aldrich), se deja secar y se guarda, hasta su uso, a 4 °C. Se obtienen así dos biosensores, el biosensor A que solo tiene GOx y el B que está funcionalizado con la mezcla de GOx + ZnO NPs. La figura 3.1 muestra la celda de medición y el biosensor terminado.

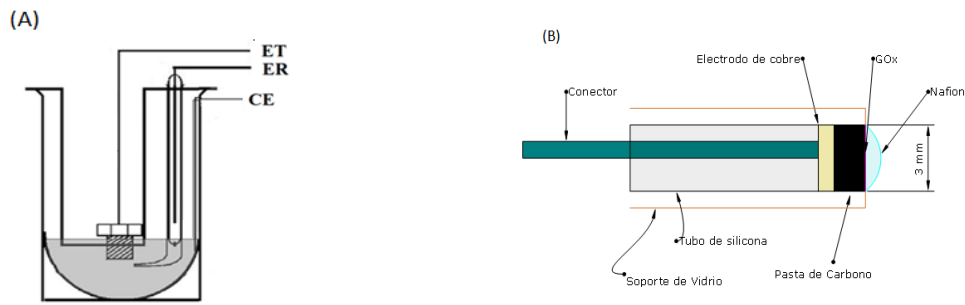


Figura 3.1: (A) Celda tripolar de medición y (B) el Biosensor

Se realiza la mezcla de GOx con las NPs de ZnO durante 24 hs a 4°C para permitir que la enzima recubra las NPs por diferencia en sus puntos isoeléctrico, y por lo tanto, obtener mayor concentración de enzima inmovilizada (por la relación superficie-volumen de las nanoestructuras). El tiempo de incubación se obtuvo a partir de resultados empíricos y que normalmente se emplean en la bibliografía. De esta manera se espera aumentar la sensibilidad del biosensor. Por otro lado, al estar las NPs recubiertas de enzima, se disminuyen los problemas de aglomeración de las mismas

### 3.3. Resultados y Discusión

La figura 3.2 muestra, a la izquierda la microfotografía SEM de las ZnO NPs depositadas sobre un sustrato de silicio luego de evaporado el solvente; y a la derecha una microfotografía de la CP sobre la que se depositaron las NPs de ZnO recubiertas con la enzima. En esta última fotografía se pueden observar claramente las hojuelas de grafito y hacia arriba a la izquierda, en los pequeños puntitos blancos, los depósitos de la mezcla de NPs con enzima. Las fotografías se muestran en diferentes escalas para poder apreciar mejor el biosensor.

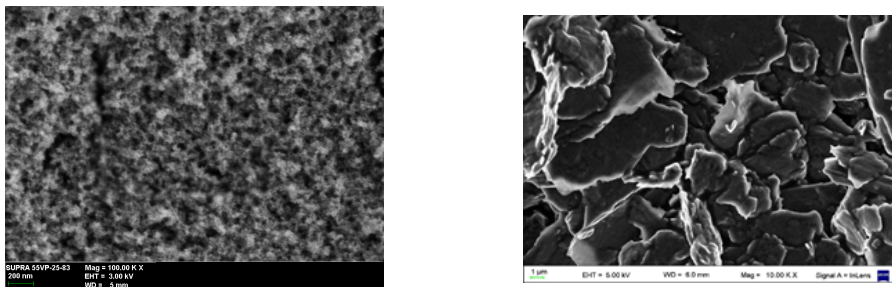


Figura 3.2: Izquierda: Imágenes SEM de las ZnO NPs usadas y Derecha: la mezcla de GOx con las NPs depositadas sobre la CP

En la figura 3.3 se grafica, en base a los valores promedios de tres biosenso-

res, la impedancia normalizada de  $Z$  y su fase calculadas como en la ecuación 3.1 (valor relativo de  $Z$  y la fase a la concentración cero de glucosa) en función de la concentración de glucosa. En (A), las mediciones de módulo y en (B) la fase, frente a distintos agregados de glucosa. En símbolos llenos naranjas, se presentan mediciones del biosensor A (solo con GOx), y en símbolos vacíos azules, las respuestas empleando el biosensor B, es decir el biosensor con las NPs de ZnO.

$$Z_{norm} = \frac{Z_{0mM} - Z_{xmM}}{Z_{0mM}} \quad (3.1)$$

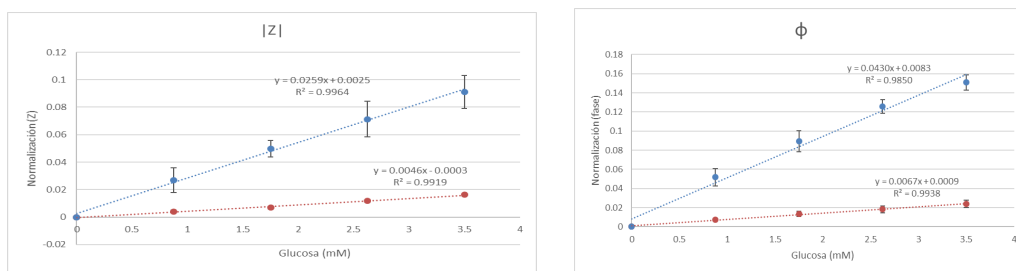


Figura 3.3: Respuesta normalizada del biosensor sólo con enzima GOx (símbolos rojos), y biosensor con GOx + NPs de ZnO (símbolos azules), donde (A) corresponde al módulo de  $Z$  y (B) a la fase.

La pendiente de la recta de regresión lineal indica la sensibilidad del sistema a los distintos agregados de glucosa. Se puede observar en la gráfica el aumento de sensibilidad que se obtiene con los biosensores fabricados con NPs de ZnO.

El cuadro 3.2 muestra la comparación entre la sensibilidad normalizada (1/mM) de ambos biosensores, tanto para el módulo de  $Z$  como para la fase, donde se observa un aumento de la sensibilidad de 1 orden de magnitud.

Cuadro 3.2: Sensibilidad del biosensor

Biosensor	Sensibilidad $ Z $	Sensibilidad $\Phi$
A	$0.0046 \pm 0.0004$	$0.0067 \pm 0.0012$
B	$0.0259 \pm 0.0038$	$0.0430 \pm 0.0018$

El método empleado para la cuantificación de glucosa es el método cronopendancimétrico [218]. Las mediciones presentadas en esta tesis, se diferencian en que el elemento biorreceptor, es decir la enzima GOx, no se inmoviliza en volumen dentro de la PC, sino que se inmoviliza en superficie por drop casting. El aumento de la sensibilidad se debe al gran aumento de la superficie de inmovilización que proveen las NPs, lo que produce como se mencionó, un aumento

en la cantidad de enzima inmovilizada y, por consiguiente, un aumento en la actividad del biosensor.

En ambos biosensores se obtuvo una respuesta lineal por debajo de los 4 mM, lo que demuestra una buena sensibilidad a bajas concentraciones. Sin embargo, la sensibilidad obtenida por el biosensor con ZnO NPs es de un orden mayor. La fase de la impedancia compleja demostró ser el aspecto con mejor sensibilidad. Se evaluó entonces el comportamiento en tres ensayos del biosensor para concentraciones menores a 1 mM. La respuesta del mismo se observó únicamente en la fase al ser más sensible.

En la Figura 3.4 se muestra la respuesta de la fase de la impedancia normalizada para el rango de concentración de glucosa entre 0 y 1 mM. Se obtuvo una sensibilidad en la fase de  $0.957 \pm 0.004$ .

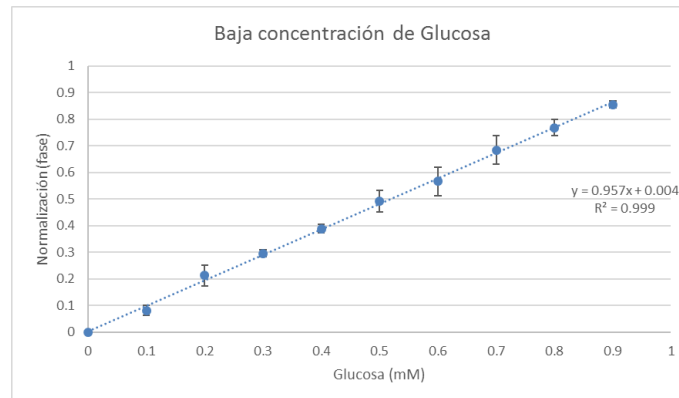


Figura 3.4: Respuesta normalizada de la fase del biosensor con enzima GOx + NPs ZnO frente a agregados de baja concentración de glucosa.

Una vez finalizadas las mediciones anteriores, los biosensores se enjuagaron con agua destilada y se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de 8 días se repitieron las mediciones de glucosa con los mismos biosensores y se obtuvieron los resultados que se observan en la figura 3.5. Cada punto es el resultado de tres mediciones de cada uno de los biosensores.

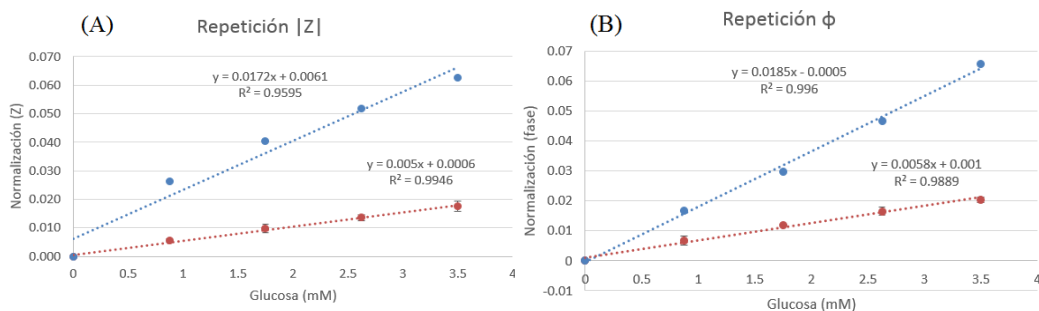


Figura 3.5: Repetición de los ensayos luego de 8 días. Donde (A) y (B) corresponden al módulo y fase.

El cuadro 3.3 muestra la sensibilidad de las repeticiones a los 8 días.

Cuadro 3.3: Sensibilidad del biosensor en la repetición

Biosensor	Sensibilidad $ Z $	Sensibilidad $\Phi$
A Rep.	$0.0050 \pm 0.0006$	$0.0058 \pm 0.0002$
B Rep.	$0.0172 \pm 0.0023$	$0.0185 \pm 0.0006$

Se observa que la sensibilidad promedio del biosensor A varía sólo un 13 % para la fase, mientras que para el biosensor B, la sensibilidad promedio disminuyó un 57% para la fase luego de 8 días. Sin embargo, se mantiene dentro del mismo orden de magnitud. Luego de 8 días, la sensibilidad promedio del biosensor B es similar al del biosensor A recién construido.

### 3.4. Conclusiones

Se estudiaron dos biosensores mediante el método cronoimpedancimétrico, con la variante de la enzima depositada sobre la superficie y con la enzima GOx previamente inmovilizada sobre nanopartículas de ZnO. En ambos casos se obtuvo una respuesta lineal por debajo de los 4 mM (rango de utilidad para las concentraciones de glucosa en sangre normales), lo que demuestra una buena sensibilidad a bajas concentraciones. Sin embargo, la sensibilidad obtenida por el biosensor con ZnO NPs es de un orden de magnitud mayor. La fase de la impedancia compleja demostró ser el aspecto con mejor sensibilidad. Con el biosensor con nanopartículas fue posible detectar concentraciones de glucosa menores a 1 mM. Esto significa que un biosensor con nanopartículas de ZnO, podría ser aplicado para la detección de concentraciones muy pequeñas de glucosa, lo que ofrece resultados promisorios en el diseño de biosensores no invasivos, es decir, que permitan registrar niveles muy bajos de glucosa, como por ejemplo en saliva. Se hicieron ensayos luego de 8 días con los mismos biosensores obteniendo una disminución de la sensibilidad, pero manteniéndose en el mismo orden de magnitud. En este caso, el biosensor B posee una sensibilidad similar al biosensor A recién construido. Esta pérdida de sensibilidad podría atribuirse a los fenómenos superficiales que pueden sufrir las NPs, ya que debido a su pequeño tamaño, la superficie es muy reactiva y sensible a ser afectada por impurezas, pudiendo mostrar un comportamiento global de menor sensibilidad como el presentado en la repetición del ensayo. Los resultados

presentados son preliminares debido a que falta evaluar la respuesta del biosensor a interferentes y muestras reales, pero muestran ser promisorios para el desarrollo de biosensores ultra sensibles.



# Capítulo 4

## Films delgados de ZnO

*La inteligencia es la capacidad de adaptarse al cambio.*

Stephen Hawking

## 4.1. Introducción

Las nanoestructuras de ZnO se han utilizado ampliamente para el desarrollo de biosensores para la medición de glucosa, debido a las características antes mencionadas. En el caso de los biosensores de glucosa, la enzima empleada es la Glucosa Oxidasa.

En esta tesis se estudiaron thin films (TF) de ZnO en el marco de un Proyecto de cooperación con la Universidad de Leipzig, Alemania con el fin de desarrollar sensores para la detección de concentraciones muy bajas de glucosa. Dentro de este proyecto de investigación se publicó un trabajo [219], donde reportamos que los thin films nanoestructurados de ZnO modifican sus propiedades de transporte al verse influenciados por soluciones en su superficie.

Los biosensores para glucosa han sido muy investigados ya que este análisis es de gran importancia en la industria alimenticia y para la salud humana.

En un esfuerzo para desarrollar sensores de glucosa más sensibles y confiables, se busca el empleo de la nanotecnología. Las nanoestructuras de ZnO se comenzaron a utilizar ampliamente alrededor de 10 años atrás. En general se utilizan los TF de ZnO como sensores de gases [220], [221], [222]. Por otro lado, los reportes acerca del uso de este material como biosensores indican que se los sumergen dentro de una solución donde se encuentra el analito de interés. Del estudio realizado, observamos que no habían reportes sobre el uso de los TF en la manera que nosotros propusimos. Para este trabajo, se deposita una gota de solución en la superficie del TF. En particular, los TF policristalinos son interesantes debido a las posibles variaciones en las propiedades de transporte relacionadas con las interfases o bordes de grano. Esta última propiedad juega un rol importante en el transporte eléctrico ya que algunas moléculas y/o átomos pueden acumularse directamente en los bordes de grano o muy cerca de ellos. Esta interfaz entre granos forma una barrera del tipo Schottky y su altura depende de los defectos o dopantes que se encuentran en ella. La conducción en el TF puede tener distintos caminos, de grano a grano o a través de los bordes. La espectroscopia de impedancia es una técnica muy útil para el estudio de estos defectos, y sobre el posible impacto de éstos sobre las propiedades de conducción, ya que puede revelar la contribución de los diferentes caminos al transporte.

## 4.2. Materiales y Método

### 4.2.1. Reactivos

Se preparó buffer fosfato (PBS) 0,07 M y pH 7,25 usando  $K_2HPO_4$  y  $Na_2HPO_4$ . Se preparó una solución de glucosa 1 M en el mismo buffer, y diluciones del anterior en diferentes concentraciones (0.25, 0.75, 1.5, 3, 4, 5 y 10 mM). La solución GOx (Glucosa Oxidasa Tipo VII de *Aspergillus Niger*, Sigma-Aldrich) se preparó con concentraciones de 48 mg / ml en PBS. Todos los reactivos eran de Sigma-Aldrich, y el agua DI (18.2 M $\Omega$ ) se utilizó para todas las soluciones.

### 4.2.2. Crecimiento de los TFs

Los TF de ZnO se crecieron usando un sistema PLD (deposición de láser pulsado) bajo una presión de vacío de  $5 \times 10^{-6}$  mbar. Los TFs orientados en el eje c fueron crecidos sobre sustratos de zafiro de orientación en el eje c (1-0 0) ( $\alpha$ - $Al_2O_3$ ) usando un láser pulsado de Nd:YAG a 5 Hz,  $\lambda=248$  nm, una energía de 650 mJ, temperaturas de sustrato de 600°C, 700 °C y 800°C y bajo una atmósfera de oxígeno de  $125 \times 10^{-3}$  bar durante la deposición. Se utilizó un objetivo de ZnO (99,999 %) (Pi Kem LTD). El soporte del sustrato fue colocado 10 cm del objetivo y el espesor del film fue controlado por el número de pulsos para obtener ca. 200 nm [223]. El período de deposición fue de 15 minutos y después de que la temperatura disminuyó a 25 °C, cada film se sonicó con un sonicador Bandelin Sonorex RK 100H con acetona, iso-propanol y agua DI durante 10 minutos. Finalmente, los films se secaron a 100 °C durante 1 h. Los films se verificaron por difracción de rayos X (espectrómetro Philips X'Pro), cuyo difractograma se muestra en la figura 4.2. En dicha figura se pueden observar varios picos, uno de ellos cercano a  $2\theta=34.7^\circ$  lo que indica que los TFs tienen orientación en el eje c [224]. Para caracterizar a los TFs con soluciones secas en la superficie se utilizó un microscopio de haz doble - Nova NanoLab 200, FEI Company. La imagen SEM en la figura 4.3 (vista normal del TF) muestra la morfología de los TFs utilizados. Como se ve, no hay una porosidad abierta para permitir la inclusión de aire o el drenaje de la solución. La sección transversal de la imagen SEM (recuadro de la Fig. 4.3) tampoco muestra porosidad (excepto un gran agujero creado durante el procedimiento de corte del TF + sustrato). Por lo tanto, las imágenes SEM refuerzan nuestro modelo propuesto de conducción (grano + borde de grano), como se esquematiza en la figura 4.1. Dicho modelo fue discutido en mayor profundidad en una publicación previa [219]. Muy brevemente, se ajustó

taron a modelos circuitales las respuestas de impedancia frente a los agregados de distintas soluciones como ser agua destilada, buffer, glucosa y enzima. A partir de los valores obtenidos de los ajustes se pudo inferir la contribución al valor de la impedancia de cada camino de conducción, donde la conducción por borde de grano se ve fuertemente afectada por las soluciones y su contribución domina la el valor de impedancia medido luego de secarse la gota del agregado [219].

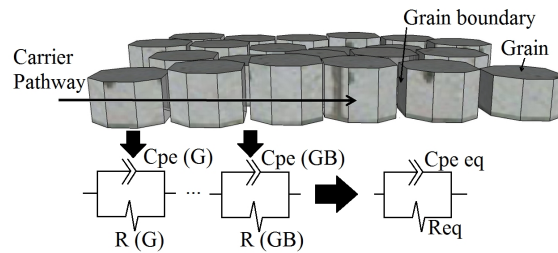


Figura 4.1: Estructura asumida del modelo de conducción de los ZnO TFs con las diferentes vías de conducción. Cada grano (G) se modela con un circuito RC paralelo, un circuito similar se utiliza para los bordes de grano (GB). El camino de conducción total se modela como el equivalente de dos circuitos en serie [219].

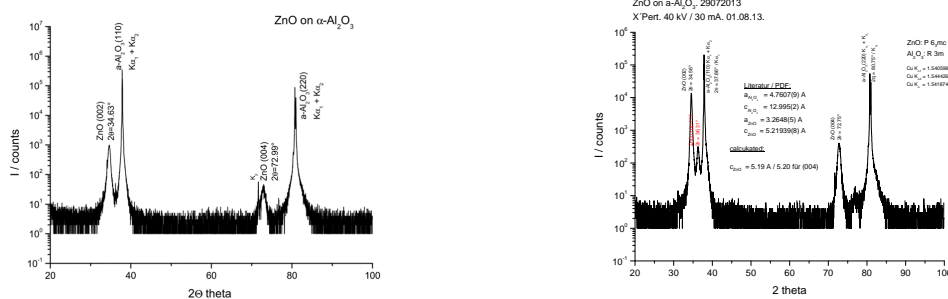


Figura 4.2: Difractograma XRD de los TF crecidos a 700 °C (izquierda) y 600 °C (derecha) con orientación predominante en el eje c.

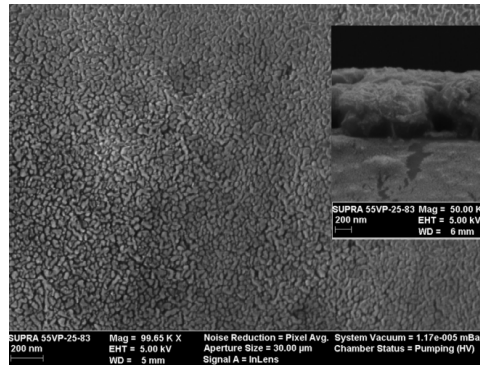


Figura 4.3: Micrografías SEM obtenida perpendicular al ZnO TF crecido sobre sustrato de zafiro con eje preferencial c. En el recuadro se muestra la vista de canto del TF.

### 4.2.3. Mediciones impedancimétricas

La impedancia eléctrica se midió con barridos de frecuencia utilizando un analizador de impedancia (Agilent 4294a). La señal era sinusoidal de amplitud de 950 mV y un rango de frecuencia de 40 Hz a 3 MHz. El thin film TF01 con dimensiones de 5 mm x 5 mm se puso en contacto eléctrico en sus extremos opuestos utilizando una configuración bipolar (dos electrodos) con la ayuda de un microscopio óptico Carl Zeiss Stemi 2000-C. Los contactos eléctricos en las muestras de ZnO se hicieron usando hilos de oro ( $\Phi = 25 \mu\text{m}$ ) uniéndolos con indio puro; las muestras se montaron en un chip carrier Kyocera (Optocap, Escocia). Un segundo lote de muestras de TFs, obtenidas a partir de la muestra TF2 crecida bajo las mismas condiciones que TF1, se cortaron con una sierra de alambre Well Diamond en barras de 1 mm x 6 mm, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 4.4. De esta manera, obtenemos 5 submuestras crecidas bajo las mismas condiciones, y se denotaron como TF21 a TF25 para aclarar que estas barras eran obtenidas de la misma muestra TF2. Se agregaron diferentes soluciones a las barras, como se puede ver esquemáticamente en la Fig. 4.5, y se midió la impedancia eléctrica antes de la adición y cada minuto hasta que se seque la gota de cada solución. Para evaluar la respuesta del biosensor, primero se deposita una gota con GOx, se deja secar durante una hora y luego se procede a medir las distintas soluciones. Para evitar la contaminación residual solo una adición de cada solución se hizo por muestra.

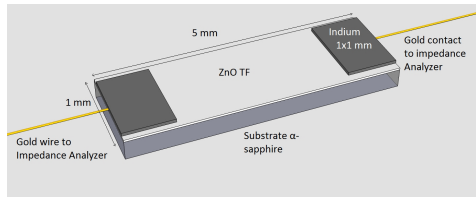


Figura 4.4: Diagrama de los contactos sobre la superficie del film.

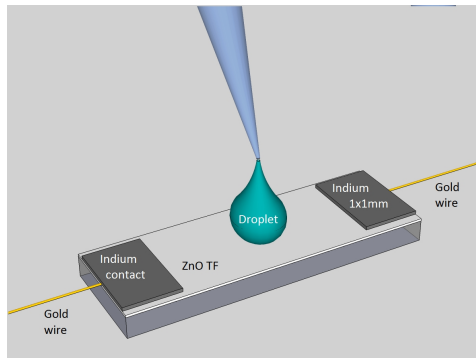


Figura 4.5: Esquema del procedimiento experimental. El área de la gota sobre los TFs fue siempre aproximadamente de  $2 \text{ mm}^2$

#### 4.2.4. Modelos circuitales

Usando el software Zview 3.0 (Scribner Associates, Inc.) se ajustaron los modelos circuitales a las medidas de impedancia. El TF de ZnO nativo, se puede ajustar el sistema como un circuito paralelo RC, como se puede ver en la Fig. 4.6. Para los ajustes se utilizó un elemento de fase constante o CPE como una capacitancia no ideal en lugar de un condensador ideal. Este elemento toma en cuenta la dispersión de frecuencia del valor de capacitancia. El factor CPE-P ( $f$ ) es igual a 1 cuando el elemento se comporta como un condensador ideal. Los valores superiores a 0,8 indican un comportamiento estrechamente capacitivo. Para esta muestra, los parámetros que se ajustan a los datos se muestran en el Cuadro 4.1.

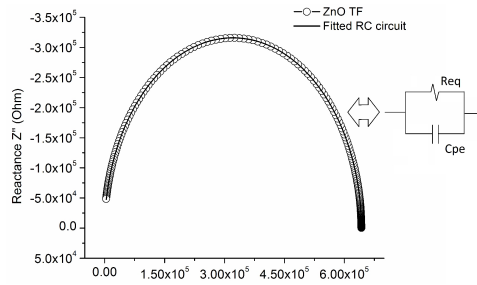


Figura 4.6: Típico diagrama Cole-Cole de un TF de ZnO con el correspondiente modelo circuital. Los datos experimentales se muestran en círculos y el ajuste en la línea continua.

Cuadro 4.1: Circuitos equivalentes utilizados para el ajuste de las mediciones impedancimétricas.

Muestra	Circuito Eq. <sup>b</sup>	R1	CPE1	R2	CPE2
ZnO TF21	R1//CPE1	$5,89 \times 10^5 \Omega$	$1,22 \times 10^{-12} \text{F}$ $f=0,99$	-	-
2,5 min	R1//CPE1-R2//CPE2	$1,04 \times 10^6 \Omega$	$1,42 \times 10^{-12} \text{F}$ $f=0,99$	$6,43 \times 10^5 \Omega$	$7,03 \times 10^{-9} \text{F}$ $f=0,93$
7,5 min	R1//CPE1-R2//CPE2	$1,04 \times 10^6 \Omega$	$1,36 \times 10^{-12} \text{F}$ $f=0,99$	$1,65 \times 10^6 \Omega$	$4 \times 10^{-9} \text{F}$ $f=0,85$
12,5 min	R1//CPE1	$2,2 \times 10^6 \Omega$	$1,27 \times 10^{-12} \text{F}$ $f=0,99$	-	-

<sup>b</sup> // Conexión paralelo. – Conexión serie

Los modelos circuitales empleados en cada tiempo cambian a medida que se seca la gota sobre ellos debido a que intervienen distintos caminos de conducción, ya sea por el grano o el borde del grano.

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Variabilidad de los TFs debida a la fabricación

La figura 4.7 muestra la representación de Cole-Cole de diferentes barras de TF de ZnO, indicadas como TF21 a TF25, cortadas del mismo TF. La impedancia eléctrica se midió siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Cada medición se realizó en ausencia de luz, y sin agregar solución. Las líneas continuas en las gráficas son los ajustes obtenidos usando el software Zview 3.0. Se nota que la impedancia  $R'$  medida a la frecuencia más baja, 40 Hz, muestra una variación promedio de dos, calculada para cada TF obtenidos del mismo sustrato. Esta

variación a bajas frecuencias muestra la inhomogeneidad del método de fabricación dentro de un mismo film. De todas maneras, estas variaciones en impedancia, intrínsecas a la fabricación de los TFs no representan un impedimento para la aplicación de biosensado puesto que para ello se utilizan los cambios relativos de la impedancia.

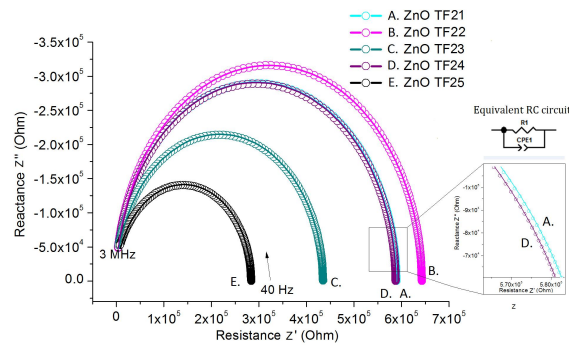


Figura 4.7: Resultados de la impedancimetría de cinco barras de TFs (TF21-5) obtenidas de la misma muestra. En el recuadro se muestra una ampliación de la gráfica de impedancia de dos TFs diferentes con valores cercanos entre ellos.

### 4.3.2. Cambios en la respuesta de impedancia por la luz ambiente

Cuando se diseñan sensores basados en semiconductores, se debe tener en cuenta el efecto que pueden tener ciertas longitudes de onda de la luz sobre su superficie. Para ello, se realizaron diferentes experimentos para explorar los cambios en la respuesta impedancimétrica ante la presencia o ausencia de luz ambiente sobre el TF, ver figura 4.8. Primeramente se expuso los TFs a la luz durante una hora y luego se midió la impedancia en oscuridad. Se pudo observar en ese caso que la impedancia aumenta aproximadamente un 2.1 % hasta el minuto 12.5. Cuando se mide pasando de mantener el electrodo en oscuridad a exponerlo a la luz, la variación de la impedancia en el minuto 12.5 fue de aproximadamente 3.3 %. Estas variaciones se asocian al efecto de la luz que crea nuevos portadores al incidir sobre el semiconductor.



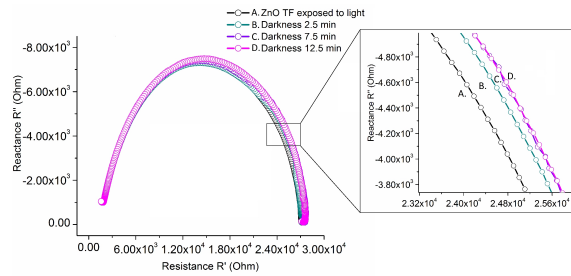


Figura 4.8: Diagramas Cole-Cole de los TFs (crecidos a 700 °C) a distintos tiempos luego de apagar la fuente de luz visible. Los TFs fueron irradiados durante 1 hora antes de cada medición.

### 4.3.3. Estudio de la influencia de la temperatura sobre los TFs

En esta sección, mostramos la influencia de la temperatura de crecimiento del TF sobre su sensibilidad a los cambios producidos a partir de la posible actividad de la GOx en su superficie. Aquí se hace la consideración de que la enzima inmovilizada sobre el TF es capaz de funcionar, excepto en el caso de haberse inactivado.

Basándose en los resultados obtenidos en el trabajo previo [219], se decidieron realizar algunos cambios en el set-up experimental. Por un lado, se disminuyó el rango de concentraciones de glucosa y de enzima, donde se pasó de 48 mg/ml a 2.4 mg/ml y, por el otro, se evaluaron distintas temperaturas de crecimiento. Del mismo modo que en el trabajo anterior la impedancia se midió sin tensión de polarización y de manera bipolar.

Los resultados obtenidos son de carácter preliminares puesto que restan evaluar otras temperaturas de crecimiento como así también soluciones con interferentes y muestras reales de sangre. Sin embargo, es posible inferir que a menor temperatura de crecimiento, más sensible es el biosensor a diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados de los TF crecidos a 600°C mostraron cambios cercanos a uno y dos órdenes de magnitud en la parte real e imaginaria de la impedancia respectivamente cuando se agregó glucosa. Los films crecidos a las otras temperaturas evaluadas no mostraron tales cambios. De aquí también se puede inferir que dichos cambios se deben a la presencia de enzima activa. Esto podría indicar la posibilidad de detectar glucosa sin la necesidad de polarizar o de usar mediadores químicos.

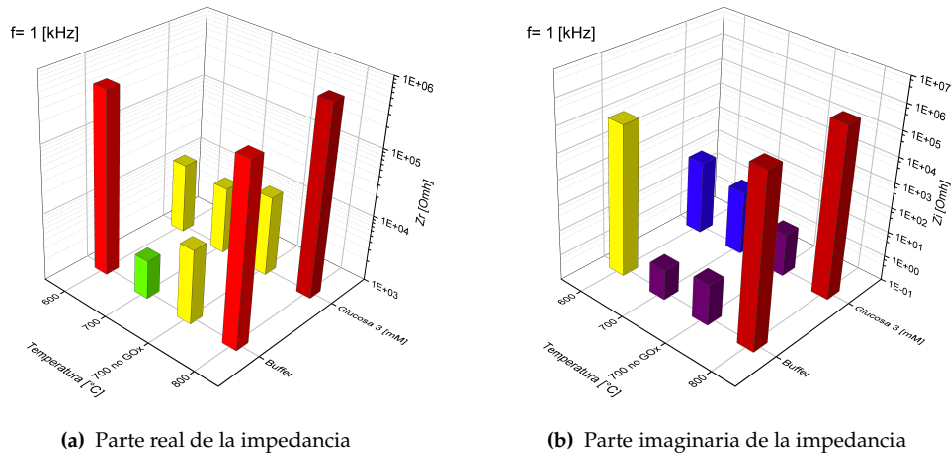


Figura 4.9: Comparación de la Parte real ( $Z_r$ ) e imaginaria ( $Z_i$ ) de las mediciones de impedancia del TF con PBS y glucosa 3 mM a una frecuencia y 11 minutos de puesto el agregado.

Debido a que los films crecidos a menor temperatura presentan granos más pequeños, se favorece la conducción por los bordes de grano por lo que los TFs crecidos a la menor temperatura se mostrarían más sensibles a la actividad de la enzima.

## 4.4. Conclusiones

Cambiando el tipo y la concentración de la solución, se investigó en qué medida un TF de ZnO es de interés para aplicaciones de biodetección. Los resultados de nuestro trabajo previo [219] muestran que la conducción de los límites de grano se ve fuertemente afectada por los diferentes agregados y su contribución domina el valor de la impedancia después del secado del agregado. Se usaron circuitos RC equivalentes utilizado para ajustar los datos. El mayor aumento de la impedancia, de 2 órdenes de magnitud, se obtiene después de la adición de una gota de Glucosa en concentración de 3 mM sólo para el TF crecido a 600°C y con enzima en su superficie. Para el desarrollo de sensores de glucosa no invasivos, el analito debe medirse en lágrimas, saliva o sudor en lugar de sangre. Dado que la concentración de glucosa es mucho menor en estos fluidos, el desafío es diseñar sensores con una sensibilidad muy alta y también con la capacidad de detectarlos en pequeños volúmenes.

# Capítulo 5

## Biosensor de afinidad

*Debemos intentar comprender el comienzo del universo a partir de bases científicas. Puede que sea una tarea más allá de nuestras capacidades, pero al menos deberíamos intentarlo.*

Stephen Hawking

## 5.1. Introducción

Este capítulo forma parte de un trabajo en colaboración donde participaron Camila Dora por parte del el Instituto Walter Schottky de la Universidad de Munich y Luis Eduardo Castro que trabajó en su tesis de grado bajo mi planificación y dirección en el Laboratorio de Medios e interfase (INSIBIO-CONICET) y el ITANOA (CONICET)-EEAOC.

Los biosensores electroquímicos se basan en la detección de cambios en la superficie que ocurren como resultado de la interacción con el analito objetivo (targets). Este mecanismo de transducción no necesita modificar los targets mediante, por ejemplo, colorantes fluorescentes; por lo tanto, constituye un método de detección sin marcadores, o como se lo conoce en inglés, label-free. [181]. Por ejemplo, en el caso de un transductor semiconductor, la interacción target-biosensor puede cambiar la acumulación o el agotamiento de los portadores.

En el caso de los biosensores inmunológicos, para proporcionar receptores inmovilizados en la superficie de modo que se genere la unión antígeno-anticuerpo, es de suma importancia una interfaz adecuada, que tenga una alta densidad de sitios de unión del receptor. También es necesario, una molécula corta, el linker, que ancla la sonda (o receptor) de afinidad a la superficie y minimiza así los efectos del electrolito. [225]. Una interfaz deseable debería promover el control conformacional del receptor con una alta eficacia de unión al target [226]. Una ruta para funcionalizar la superficie del electrodo es a través de la deposición de monocapas autoensambladas (SAM). El uso de esta técnica en biosensores y otros campos ha estado bajo la lupa durante varios años [227] [228] [229]. Las moléculas de organofosfatos, tales como el ácido fosfónico (PA), el ácido alquilsulfónico y sus sales, se han usado para modificar la superficie de óxidos metálicos [230]. Estos grupos crean enlaces metal-óxido-PA a través de una heterocondensación y coordinación. Los ácidos fosfónicos y los fosfonatos pueden adsorberse en la superficie del óxido metálico en un modo mono, bi o tri-dentado [231] [232]. Éstos no sufren las mismas restricciones de deposición y almacenamiento que los silanos, y los pasos de modificación no son sensibles al agua [233].

Los PA se han utilizado para modificar las nanopartículas de ZnO [234] y otros tipos de nanoestructuras de este óxido metálico. Mientras que los tioles han demostrado ser prometedores, el uso de grupos de anclaje de aminas puede ser problemático porque típicamente no resultan en una monocapa robusta. Los ácidos carboxílicos tienden a no unirse fuertemente a la superficie de ZnO,

y los silanos, aunque pueden formar monocapas en ZnO, son hidrolíticamente sensibles y propensos a la formación de múltiples capas en varios sustratos de óxidos metálicos [235]. La interfaz organizada y covalentemente unida debe ser superior a los sistemas no específicos que dependen simplemente de la fisisorción. Las monocapas autoorganizadas de organofosfonatos proporcionan tales plataformas; son sistemas estables y elegantes que se pueden usar para unir sistemas biológicos al electrodo [236] [237] [238]. En comparación con la adsorción física, los enlaces químicos obviamente pueden minimizar la interferencia del entorno [239]. Como matriz de inmovilización para uniones covalentes, se han empleado polímeros como polipirrol, polianilina o polietilenimina (PEI), etc [240] [241]. Estos polímeros generalmente implican un grupo de activación o un linker antes de unirse a la biosonda. Hay muchos agentes químicos para tal fin, glutaraldehído, carbonildiimidazol (CDI) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) más N-hidroxisuccinimida (NHS) [242].

En el marco de esta tesis, se realizó la modificación de electrodos de oro con monocapas autoensambladas de ácidos fosfónicos (SAMP) y sobre ella, la adhesión de NPs de ZnO mediante una unión covalente. Se evaluaron dos tipos de alcantioles con dos grupos terminales diferentes para formar la SAM: 1) con un grupo metilo (SAM2) y 2) con un grupo de ácido fosfónico (SAMP1). La calidad y la estabilidad de las NP de ZnO enlazadas a las SAMP se evaluaron mediante AFM, XPS y ángulo de contacto. El análisis de XPS y AFM mostró la presencia de NP en la muestra de SAMP 1 después de 6 horas de ultrasonificación en etanol. Esta estructura se empleó como sustrato para la inmovilización de anticuerpos anti-Neomicina Fosfotransferasa II. La biosonda se ligó empleando PEI activado con glutaraldehído. La preparación del inmunosensor se caracterizó por voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) mostrando diferentes comportamientos en presencia de las nanoestructuras de ZnO. El sistema diseñado resultó en un sustrato nanoestructurado de fácil fabricación y muy estable.

## 5.2. Materiales y métodos

La celda electroquímica empleada tiene un volumen de 1 ml y consiste en 3 electrodos: un electrodo de trabajo (WE), un pseudo electrodo de referencia de Ag/AgCl (RE) y un contra-electrodo de IrO<sub>2</sub> (CE).

Las soluciones utilizadas en las mediciones fueron: buffer PBS 0,01 M a pH 7,2 y con electrolito soporte, KCl 0,1 M; ferrocianuro de potasio (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-4</sup>)

y ferricianuro de potasio ( $K_4[Fe(CN)_6]^{-3}$ ) ambos en una concentración de 1 mM. Estas dos últimas soluciones se denominarán a partir de aquí Ferro/Ferri.

Para la inmovilización de anticuerpos y el bloqueo del electrodo se utilizó el PBS antes mencionado con Tween 20 al 0.05 %. La solución de PEI 1 % se obtuvo diluyendo Polietilenimina (50 % en agua) en PBS. El glutaraldehído se diluyó de su concentración original, 5 %, hasta llegar al 1 % en PBS.

Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada de conductividad igual o cercana a  $2 \mu S$  a  $24^\circ C$ .

### 5.2.1. Anticuerpo y antígeno

Los antígenos que se emplearon para la evaluación de este sensor, fueron obtenidos en una cepa modificada de *E. coli*, en la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombres" por investigadores con los que trabajamos en colaboración para el desarrollo del biosensor de HLB que se describirá en el este capítulo. La descripción de cómo obtenerlos se puede leer en el Anexo A. Los anticuerpos empleados para el desarrollo del biosensor inmunológico fueron anticuerpos primarios comerciales marca EMD Millipore, Anti-Neomycin Phosphotransferase II (código: 06-747) y anticuerpos secundarios marcados con HRP (Goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated, código: 12-348)

### 5.2.2. Análisis Dot-Blot

Se realizó un análisis Dot-Blot para determinar las concentraciones de anticuerpos adecuadas para inmovilizar en el biosensor. Estas concentraciones permitirán confirmar ópticamente la correcta inmovilización de las biomoléculas en el sensor. A su vez, permitirán determinar la cantidad de anticuerpos adecuada para tener una señal medible luego de la unión antígeno-anticuerpo en el sensor. La descripción del método y su resultado se puede leer en el Anexo A.

### 5.2.3. Preparación del electrodo

#### 5.2.3.1. Monocapas autoensambladas con ZnO NPs

Las monocapas autoensambladas (SAMs) fueron depositadas sobre electrodos de oro policristalino sobre sustrato de silicio con una capa de adhesión de titanio (comprados en Sigma Aldrich). Estos sustratos se eligieron ya que son

compatibles con las técnicas actuales de fabricación de microelectrónica. Las ZnO NPs fueron sintetizadas a partir del método reportado por Bahnemann et al. [215].

La SAM formada con las moléculas 11-mercapotoundecylphosphonic acid (SAMP 1) se depositaron incubando al electrodo en una solución 1 mM de dichas moléculas durante 24 hs a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno. El uso de atmósfera modificada es necesario para evitar la posible oxidación de los grupos tioles, lo que puede interferir la formación de enlaces S - Au. Usando el mismo protocolo se depositó la SAM de 1-undecanethiol (SAM 2). La segunda SAM se utilizó como referencia para estudiar el efecto del enlace entre el grupo fosfonato y las ZnO NPs como se muestra en la figura 5.1. Luego de formar las SAMs, ambos electrodos fueron enjuagados y sonicados durante 10 minutos en etanol absoluto para remover moléculas adsorbidas y evitar la formación de multicapas.

Las ZnO NPs usadas para la funcionalización de los electrodos se encuentran en una suspensión coloidal en 2 - propanol. Las NPs se depositaron sobre oro y ambas SAMs mediante drop casting de 10  $\mu$ l de suspensión, luego se dejó evaporar durante 24 hs a temperatura ambiente. Previo al drop casting, se ultrasonizó la suspensión durante 2 hs para disolver cualquier agregado de ZnO que haya podido formarse. Luego de la evaporación, los electrodos se sometieron a 20 minutos de ultrasonido en etanol absoluto para remover el exceso de NPs. Posteriormente se realizó un ciclo de 6 hs de ultrasonido para estudiar la estabilidad del enlace SAM-NPs.

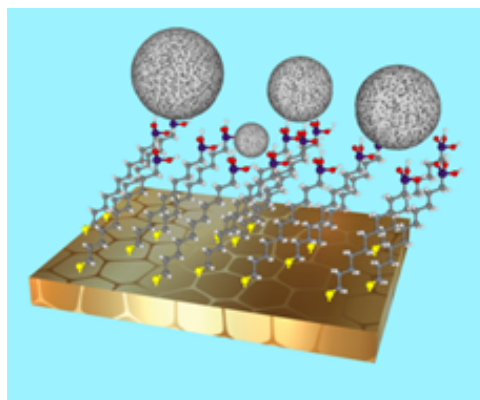


Figura 5.1: Esquema de las ZnO NPs enlazadas a la SAMP 1 sobre el electrodo de oro. La figura no se encuentra a escala.

### 5.2.3.2. Experimentos electroquímicos

El pseudo electrodo de referencia consta de un alambre de plata con AgCl electrodepositado. El proceso de electrodeposición de AgCl consistió en pasar primero una corriente continua de 1 mA durante 10 minutos y luego otra de 10 mA por 2 minutos en una solución de NaCl 0,5 M. Este clorurado se hizo antes de cada set de medición. El contraelectrodo usado en las mediciones se preparó depositando IrO<sub>2</sub> sobre acero AISI 304 según el método de Kakooei et al. [243]. Brevemente, se hicieron 7 sets de voltametría cíclica. Cada set consistió de 15 ciclos entre -0,5 y + 0,65 V vs el RE comercial a una velocidad de 50 mV/s. El electrodo se mantuvo en la solución de iridio durante 3 minutos entre cada set. Al final del procedimiento se mantuvo al electrodo durante 20 minutos en la solución. Con este método se logra una reducción de al menos 2 órdenes de magnitud en la impedancia de interfase [244].

La caracterización electroquímica se realizó con un equipo Solartron 12508 W, el mismo consiste de un analizador de respuesta en frecuencia (Solartron 1250) y un potencióstato (Solartron SI1287). Todas las mediciones se realizaron dentro de una jaula de faraday para evitar ruido electromagnético. Para conectar el WE al equipo se diseñó una pinza de modo que sólo haya contacto eléctrico con la superficie de oro evitando el contacto con el buffer.

Los voltagramas se realizaron entre -0,6 y + 0,6 V. La espectroscopía de impedancia se realizó con un potencial de tensión alterna de 7,1 mV RMS y a dos potenciales de polarización, 0,15 y 0,17 V. El rango de frecuencias estudiado fue de 65 kHz a 0,1 Hz tomando 15 puntos por década.

## 5.3. Resultados y Discusión

Para evaluar la calidad de la SAM formada, se hicieron mediciones con varias técnicas físicas. Entre ellas encontramos, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), y static Contact Angle (CA).

### 5.3.1. Espectroscopía de fotones de rayos X

La presencia de las SAMs se puede confirmar a través de la señal S2p a 163 eV, la cual es característica de la formación del enlace Au-S-C (Figure 5.2b) [245]. Esto es válido para ambas SAMs. Por otro lado, el análisis de la señal P2p a 135 eV confirma la presencia del grupo fosfonato sólo en la muestra modificada con la SAMP 1 [246] (Figure 5.2c). El incremento de la señal perteneciente al



C1s (Figure 5.2a) también puede tomarse como indicador de la presencia de SAMs en la superficie. Sin embargo, se debe considerar que la intensidad de esta señal puede verse afectada por contaminantes orgánicos en la superficie de la muestra.

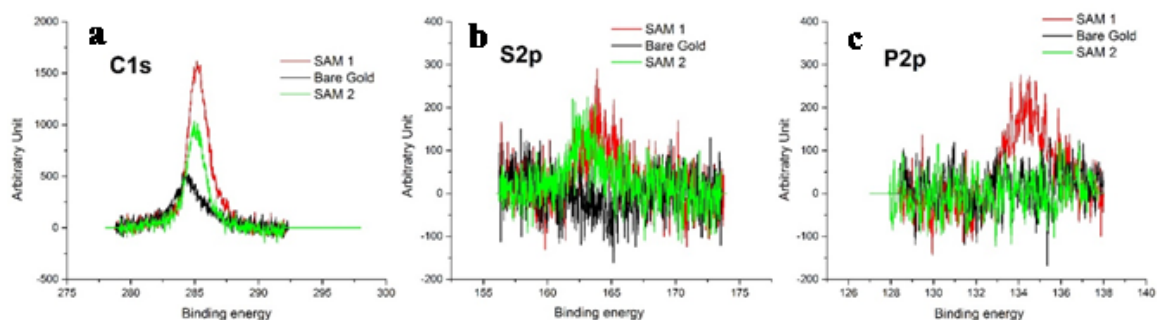


Figura 5.2: Análisis del XPS de las muestras modificadas con SAMP 1 (rojo), SAM 2 (verde) y oro (negro). El contenido superficial de carbono, azufre y fósforo se muestran respectivamente en **a**, **b** and **c**.

### 5.3.2. Ángulo de contacto

Se midió el ángulo de contacto estático utilizando una gota de  $3 \mu\text{l}$  de agua pura colocada sobre diferentes lugares de las superficies de 5 muestras para cada funcionalización. Las desviaciones estándares se encontraron entre  $1^\circ$  y  $6^\circ$ , por ello se toma el mayor valor como el error estimado para todas las mediciones. Como se puede observar en la figura 5.3, la muestra SAMP 1 se muestra moderadamente hidrofílica con un ángulo de contacto igual a  $63^\circ \pm 6^\circ$  [246]. Mientras que la muestra con SAM 2 es moderadamente hidrofóbica y tuvo un ángulo de  $96^\circ \pm 6^\circ$  [247]. Estos resultados son coherentes con el hecho de que la SAMP 1 posee grupos terminales fosfonatos que son hidrofílicos, mientras que la SAM 2 tiene grupos metilos los cuales son hidrofóbicos. Este resultado, junto con las caracterizaciones realizadas con el XPS y AFM, son acordes a la hipótesis de la existencia de una monocapa autoensamblada compacta sobre la superficie de oro.

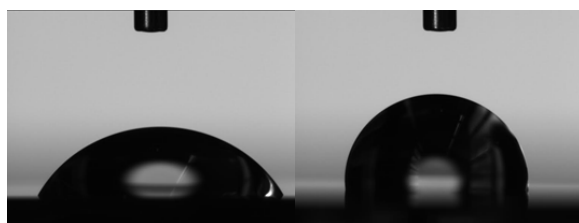


Figura 5.3: Ángulo de contacto estático de la SAMP 1 (izquierda) y SAM 2 (derecha).

### 5.3.3. Estabilidad de las SAMs

Luego de la formación de las SAMs, se continuó funcionalizando al electrodo con nanopartículas de ZnO (ZnO NPs). Éstas se depositaron sobre ambas SAMs por drop casting. Para evaluar tanto la estabilidad de las SAMs como de las ZnO NPs, se sometió a cada electrodo a ultrasonicación en etanol absoluto. Primero se ultrasonicó durante 20 minutos y se evaluó con XPS el pico del Zn2p. La figura 5.4 (a). muestra los picos normalizados. Se puede observar que la intensidad del pico del electrodo con SAMP 1 es casi el doble de los otros electrodos. Este resultado indica que la presencia del grupo funcional fosfonato es el que permite que las ZnO NPs permanezcan enlazadas a la superficie del electrodo.

Para evaluar mejor la estabilidad, se sometieron a los electrodos a 6 horas de sonicación en etanol absoluto. Luego, fueron caracterizados con XPS. La figura 5.4 (b) muestra los picos normalizados del Zn2p de los electrodos con SAMP 1 y SAM 2 luego de las 6 horas de ultrasonido. La intensidad de ambos picos disminuyó con respecto al medido luego de 20 minutos en ultrasonido. Sin embargo, es interesante resaltar que la relación entre los picos de los electrodos con SAMs pasa de 2:1 (luego de los 20 minutos) a 14:1 (luego de 6 hs).

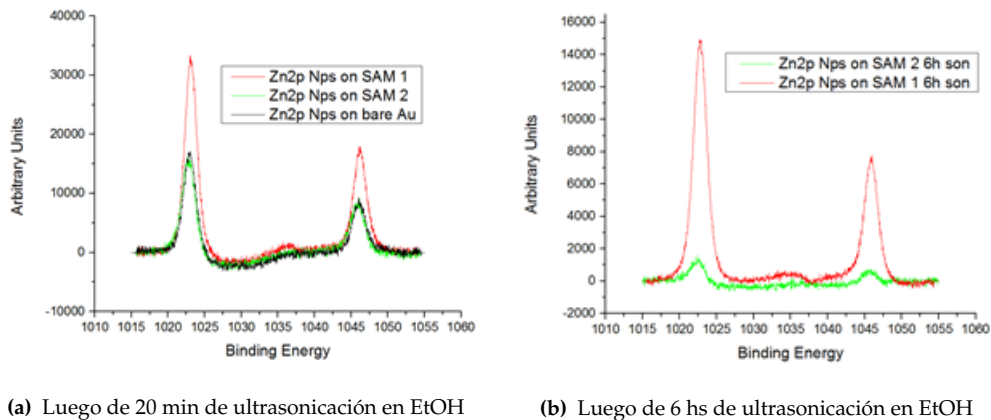


Figura 5.4: Análisis del contenido de Zn luego de depositar las NPs, donde SAMP 1 es la curva en rojo, SAM 2 la verde y el oro la curva negra.

Este resultado se puede explicar considerando que las ZnO NPs tienden a interactuar electroestáticamente con la superficie del oro y tienden a la agregación, permaneciendo adsorbidas débilmente sobre la superficie. Por otro lado, el grupo funcional fosfonato es capaz de formar enlaces químicos con el ZnO [248], por lo tanto, sólo en este último caso las NPs permanecen en el electrodo incluso luego de varias horas de ultrasonido. Esta característica puede ser muy útil para obtener una distribución homogénea de NPs sobre la superficie. Este grupo funcional permitiría también la fabricación de dispositivos con patrones específicos combinando distintas moléculas para las SAMs y distintas nanoestructuras de ZnO.

La figura 5.5 muestra micrografías SEM donde: en la figura (a) se muestra un drop casting de ZnO NPs sobre un sustrato de SiO<sub>2</sub>. En la figura (b) se puede observar que no es posible la identificación de las ZnO ni incrementar la magnificación debido a que las moléculas se queman por el haz de electrones. Las subfiguras (c) y (d) muestran dos magnificaciones del electrodo con SAMP 1 donde se pueden ver las ZnO NPs.

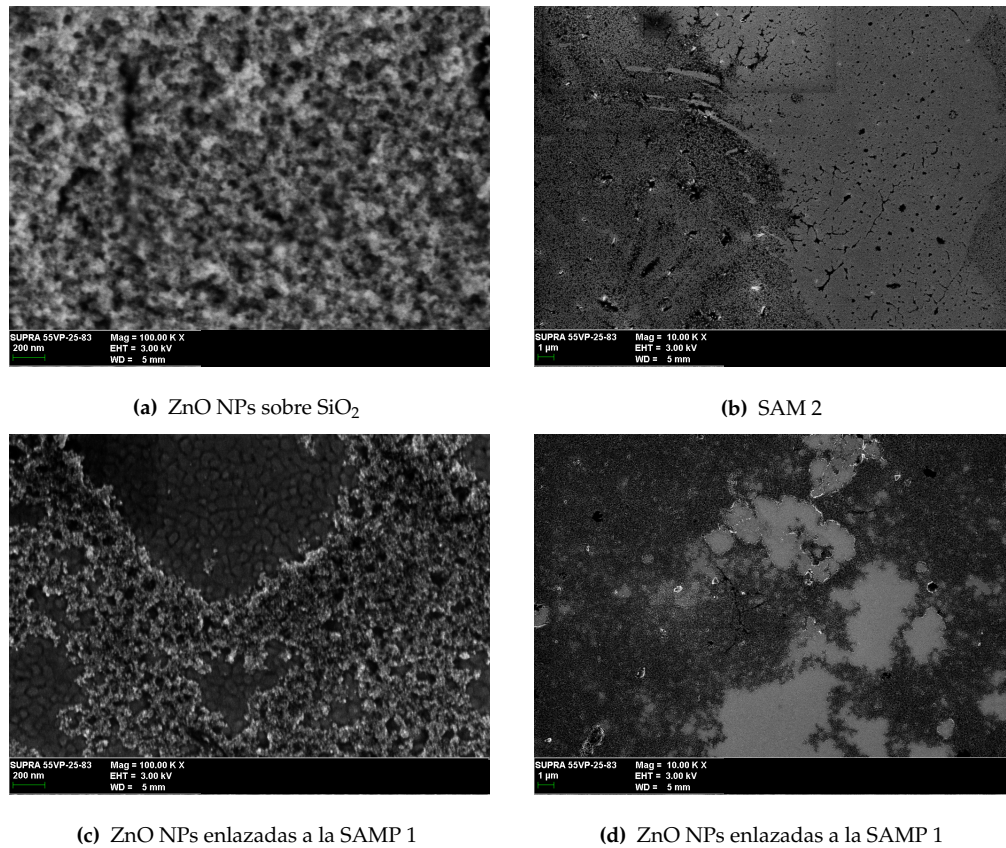


Figura 5.5: Micrografías SEM de: a) NPs de ZnO sobre Silicio, b) electrodo con SAM 2, c) y d) dos magnificaciones del electrodo con SAM 1 y ZnO NPs.

### 5.3.4. Caracterización electroquímica

#### 5.3.4.1. Electrodo con SAM 2

Las monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro y la posterior inmovilización de anticuerpos se estudiaron por medio de la voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia (EIS) en una solución con Ferro/Ferri. La figura 5.6(a) los voltagramas del electrodo solo de oro (negro), oro + ZnO NPs (azul claro) y con la SAM 2 (rojo). La figura 5.6(b) muestra sólo los voltagramas del electrodo funcionalizado con SAM 2. Se puede observar la disminución de la corriente debido a la presencia de la SAM. Este fenómeno puede atribuirse a la imposibilidad de las especies reactivas para llegar a la superficie del electrodo ya que posee una capa compacta de moléculas.

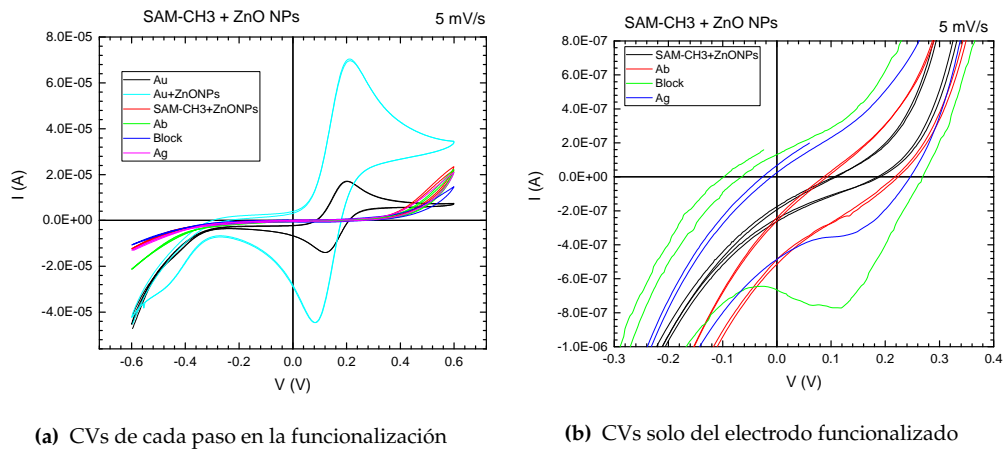


Figura 5.6: Voltagramas a 5 mV/s

En la figura 5.7 se puede observar el diagrama de Nyquist obtenido a partir de las mediciones de impedancia. Cada curva representa un paso en el proceso de la funcionalización del electrodo para el desarrollo del inmunosensor. Se puede observar como se va modificando la impedancia a medida que se va funcionalizando el electrodo. La gráfica de biosensor inmunológico corresponde a la curva turquesa luego de inmovilizado el anticuerpo y realizado el bloqueo para evitar uniones no específicas. Se observa claramente cómo la impedancia cambia luego del agregado del antígeno.

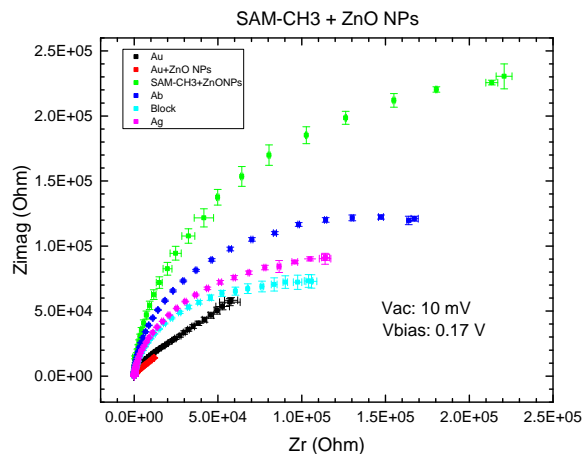


Figura 5.7: Diagrama de Nyquist en 1 mM Ferro/Ferri

#### 5.3.4.2. Electrodo con SAMP 1

Las mediciones del electrodo con SAMP 1 en solución de Ferro/Ferri (figura 5.8(a), rojo y negro en la subfigura (a)) revelaron una intensidad de corriente atenuada junto con una mayor separación entre los picos redox compado con

el electrodo de oro + ZnO NPs. Esto indica la pasivación de la superficie al formarse la SAMP.

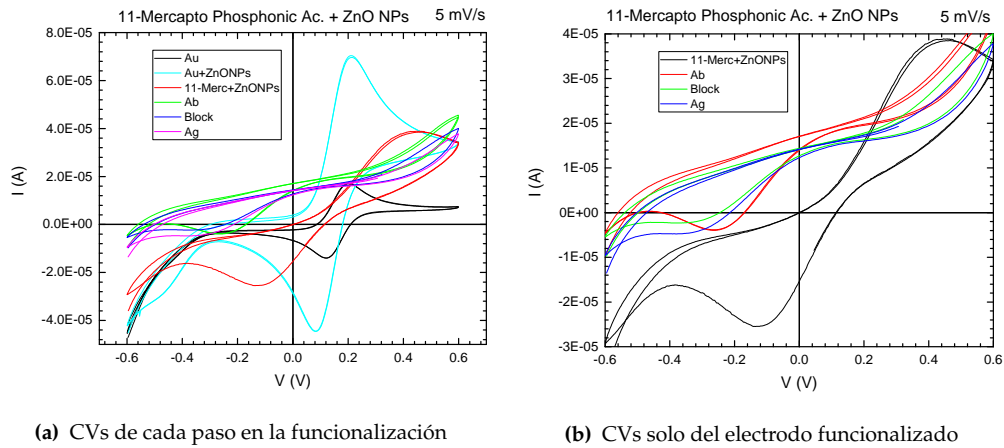


Figura 5.8: Voltagramas a 5 mV/s

La figura 5.8(b) (curva negra) muestra los picos redox del electrodo con SAMP 1. Al seguir con los pasos de la funcionalización (anticuerpos en rojo, bloqueo en verde y antígeno en azul) el pico anódico deja de observarse. Por otro lado, el pico catódico permanece pero con menor intensidad y corrido a potenciales más negativos.

La figura 5.9 muestra la dependencia lineal de los picos redox de corriente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del electrodo modificado con la SAM 1.

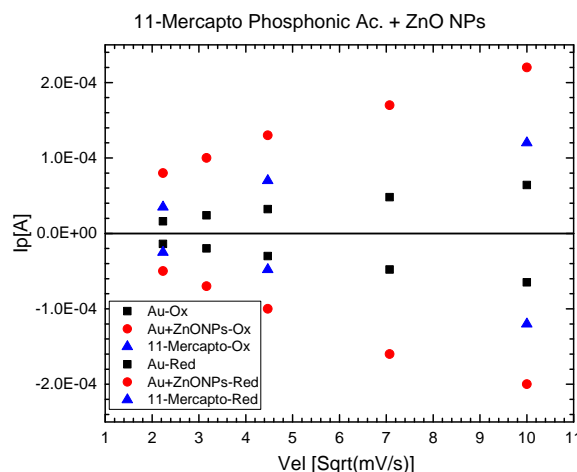


Figura 5.9: Pico de la corriente vs. la raíz cuadrada de la velocidad de barrido

Es interesante notar cómo el pico anódico es más intenso que el catódico para los electrodos de oro + ZnO NPs y con SAMP 1. Esto se puede ver ya que la relación  $I_{pa}/I_{pc}$  es mayor que 1 (ver cuadro 5.1). Este resultado sugiere que

la cantidad de especies oxidadas es mayor que las reducidas. Se podría inferir que las ZnO NPs actuarían como un agente reductor de las especies oxidadas como lo sugiere Antuch et al. [249].

Cuadro 5.1: Relación entre los picos Anódicos y Catódicos de la corriente.

Velocidad [mV/s]	$I_{p_a}/I_{p_c}^a$		
	Au	Au+ZnO NPs	SAMP 1
5	0.98	1.11	1.51
10	0.97	1.09	–
20	0.96	1.10	1.63
50	0.98	1.06	–
100	0.98	1.04	1.52

<sup>a</sup> Abreviaciones:  $I_{p_a}$ : pico anódico;  $I_{p_c}$ : pico catódico.

### 5.3.4.3. Detección impedancimétrica del NPTII

En la figura 5.10 se puede observar el diagrama de Nyquist para cada paso de la funcionalización, medido en solución de Ferro/Ferri. La subfigura (a) muestra las curvas obtenidas con los electrodos previo a la deposición de la SAMP, mientras que en la subfigura (b) se muestran sólo las curvas del electrodo luego de la funcionalización. Se puede observar que la impedancia se incrementa al depositar los anticuerpos (curva azul oscura) y luego de nuevo se incrementa ante la presencia del antígeno en solución (curva magenta). El procedimiento de bloqueo bloqueo se refiere al sistema luego del paso de bloqueo en inmunosensores, realizado para evitar uniones no específicas. Como se puede observar, el mismo no produjo cambios significativos en la impedancia.

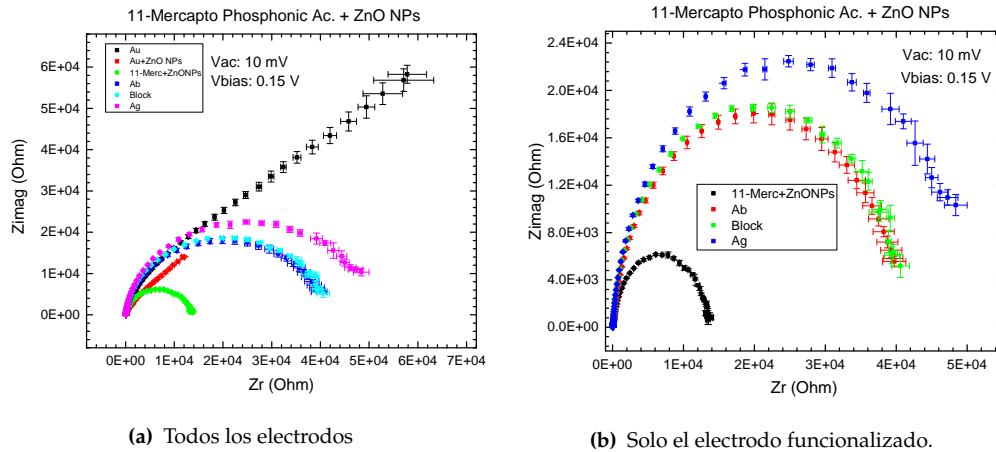


Figura 5.10: Diagramas de Nyquist en 1 mM Ferro/Ferri

Como se puede observar en la figura anterior, el sensor permite determinar la presencia de una antígeno unido al anticuerpo. La resistencia de transferencia de carga o  $R_{ct}$  se obtuvo ajustando los datos experimentales con el software Zview<sup>®</sup> usando el modelo modificado de Randles [217] [250]. El cambio porcentual en la resistencia de transferencia al inmovilizar los anticuerpos sobre las ZnO NPs es de un poco más que 200%. Este cambio es prácticamente el mismo que se tiene luego de medir el paso del bloqueo. Por otro lado, la resistencia de transferencia de carga (calculado a partir del gráfico de Nyquist de la figura 5.10) presenta cambios de alrededor del 20% entre el anticuerpo/bloqueo y cuando se une el antígeno en una concentración de 20 ng/ml. Así mismo, se destaca la variación despreciable que presenta el sistema ante la inmovilización del anticuerpo y cuando se realiza el bloqueo de la superficie. Estos resultados preliminares aunque fueron muy promisorios, no se pudieron continuar estudiando debido a la falta del anticuerpo, que por razones presupuestarias, no se pudo volver a comprar.

## 5.4. Conclusiones

En este capítulo se mostró cómo la ingeniería de superficie permite modificar electrodos de manera estable y efectiva. Se Inmovilizaron nanopartículas de ZnO enlazadas covalentemente a un electrodo de oro por medio de una monocapa autoensamblada con un grupo funcional, el ácido fosfónico. Dicha inmovilización fue producto de un método simple y probó gran estabilidad, incluso luego de 6 horas en un baño ultrasónico donde el electrodo estuvo inmerso en etanol absoluto. Estas nanopartículas fueron las que permitieron posteriormen-



te la inmovilización de un anticuerpo. Por último, el sistema presentó resultados preliminares satisfactorios para la detección de un antígeno. Se continúa actualmente analizando estos biosensores inmunológicos en el marco de una tesina de grado de ingeniería biomédica.

## Capítulo 6

# Nanopartículas de Prussian Blue para sensado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*El viaje en el tiempo solía ser considerado solo como algo de la ciencia ficción, pero la teoría general de la relatividad de Einstein permite considerar la posibilidad de que podríamos deformar el espacio-tiempo lo suficiente como para que usted pueda irse en un cohete y volver antes de salir.*

Stephen Hawking

## 6.1. Introducción

El Prussian Blue (PB) es un hexacianoferrato de hierro capaz de reducir el  $H_2O_2$  a potenciales de polarización cercanos a 0V. Una de sus características clave es su estructura cristalina, la cual permite la entrada solo de moléculas pequeñas como el  $H_2O_2$ . En general, este material se utiliza electrodepositándolo sobre la superficie de un electrodo lo que genera una capa redox [47].

La gran actividad electrocatalítica de este material hacia el  $H_2O_2$  hizo que se lo denomine como "peroxidasa artificial". Además presenta un comportamiento electrocrómico, se transforma en incoloro en su forma reducida (PW) y cuando se lo oxida se transforma en verde, lo que se denomina Prussian Green (PG) [44]. Se reportaron diversas formas de modificar electrodos con PB y otros complejos con metales diferentes al hierro como ser níquel, magnesio, etc [251] [252]. Sin embargo, estos electrodos presentan desventajas en lo referido a la estabilidad a largo plazo y sensibilidad a los cambios de pH del medio [45].

## 6.2. Materiales y Métodos

### 6.2.1. Síntesis de las nanopartículas

Las nanopartículas de Prussian Blue fueron sintetizadas siguiendo el protocolo desarrollado por Shokouhimehr et al. [253]. Brevemente, primero se agregó 0,5 M de ácido cítrico a 20 ml de una solución acuosa de  $FeCl_3$  con agitación a 55 °C. Por separado se prepararon otros 20 ml de  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1 mM con idéntica cantidad de ácido cítrico, también bajo agitación a 55 °C. Por último, ambas soluciones se mezclaron bajo una fuerte agitación magnética a 55 °C. Inmediatamente se formó una dispersión de color azul. Para poder separar las PBNPs de la solución de síntesis, se agregó a esta solución un volumen igual de acetona. A esta nueva mezcla se la centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, donde se obtuvo un pellet de las PBNPs. Este pellet fue resuspendido en 20 ml de agua destilada con ayuda de un limpiador ultrasónico y fueron separadas de nuevo mediante el agregado de acetona y centrifugación. Este proceso de separación se repitió dos veces más.

### 6.2.2. Equipo y celda electroquímica

Las mediciones electroquímicas fueron llevadas a cabo con un equipo Solartron 12508W, compuesto por un potencióstato, Solartron 1287 y un analizador

de respuesta en frecuencia, Solartron 1250.

Todos los experimentos electroquímicos fueron realizados en una celda tri-polar, donde WE es el electrodo de trabajo, RE el electrodo de referencia de Ag/AgCl y CE el contra-electrodo fabricado de acero AISI 304 y forma cóncava. El WE es de oro, circular con un área de  $1\text{ cm}^2$ . Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico.

### 6.2.3. Preparado del electrodo

Se utilizaron dos tipos de electrodos al momento de realizar los experimentos. Uno de ellos fue el disco de oro descrito en el trabajo de Zamora et al. [254]. El segundo, se preparó electrodepositando óxido de iridio (EIROF) sobre un electrodo de oro de igual características que el primero. Para la preparación de la solución de electrodeposición se siguió el método de Kakooei et al. [243] [255] pero con una modificación. Brevemente, se realizaron 7 sets de voltogramas donde en cada uno se hacen 15 ciclos entre -0,5 y 0,65 V versus el RE a una velocidad de 50 mV/s. Entre cada set se hizo una pausa de 3 minutos sin sacar el electrodo de la solución. Al final se mantuvo el electrodo inmerso en la misma solución durante 20 minutos. Todo el proceso se realiza al abrigo de la luz.

Antes y durante cada set de electrodeposición se midió impedancia a frecuencias de 0,1 - 65 kHz, 50 mV AC y 0 V DC versus RE.

Antes de funcionalizar los electrodos con PBNPs se les realizó una limpieza catódica. La misma consiste de realizar barridos cíclicos en potencial ente 0 y -1 V a velocidad de 50 mV/s en PBS.

La funcionalización se llevó a cabo usando la técnica "Dropcasting". A cada electrodo se le depositaron  $10\ \mu\text{l}$  de suspensión de PBNPs y se dejaron secar en la heladera a  $-4\ ^\circ\text{C}$  donde permanecieron hasta su uso.

### 6.2.4. Mediciones electroquímicas

Los voltogramas cíclicos (CV) se hicieron entre -0,6 y 0,6 V a varias velocidades. La cronoamperometría se realizó polarizando a 0 V versus RE. Todas las mediciones se realizaron en buffer PBS 0,01 M, pH 7,2 y KCl 0,1 M.

La respuesta en EIS se registró usando polarización alterna ( $V_{ac}$ )= 10 mV y continua ( $V_{DC}$ )= 0 V versus Ag/AgCl. La curva de calibración se construyó calculando el módulo porcentual normalizado (PMN) y tomando de éste el valor obtenido para una frecuencia en particular [217].

$$PMN = \frac{Z_{PBS} - Z_{H_2O_2}}{Z_{H_2O_2}} \cdot \frac{1}{H_2O_2(mM)} \cdot 100 \quad (6.1)$$

Antes de cada experimento se registró el potencial de circuito abierto hasta que su variación fuera menor o igual a 0,05 mV/s. Este valor se estableció para determinar como estable la interfase.

Para evaluar la histéresis de los electrodos se midieron ambos electrodos en PBS. Luego al electrodo de Au-PBNPs se le agregó 1 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al de Au/EIROF-PBNPs 10μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La prueba se realizó acorde a la siguiente secuencia: 1) PBS, 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; se vacía la celda; 3) PBS, 4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hasta obtener más de 5 agregados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se termina el set midiendo en PBS.

### 6.2.5. SEM

Las micrografías del microscopio electrónico de barrido fueron tomadas usando un microscopio Zeiss Supra 55 VP. Éste pertenece al Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME- National University of Tucuman-CONICET).

### 6.2.6. Espectrofotometría

Los espectros UV-visible fueron tomados con un equipo Hitachi U1900 perteneciente al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología.

## 6.3. Resultados

### 6.3.1. Caracterización

La figura 6.1 muestra el espectro de absorbancia, donde la curva en negro pertenece a los precursores, en azul se muestra la suspensión de PBNPs y en rojo su coeficiente de extinción molar, estimado a partir con la siguiente expresión:

$$Coef = \frac{\lambda(nm) \times Vol(cm^3) \times \rho(g/cm^3) \times N_a^o \times L}{C(g/L)} \quad (6.2)$$

Donde, λ es la longitud de onda, Vol es el volumen de la nanopartícula, ρ es la densidad, N<sub>a</sub><sup>o</sup> es el número de avogadro, L la longitud de paso de la cubeta y C la concentración molar.

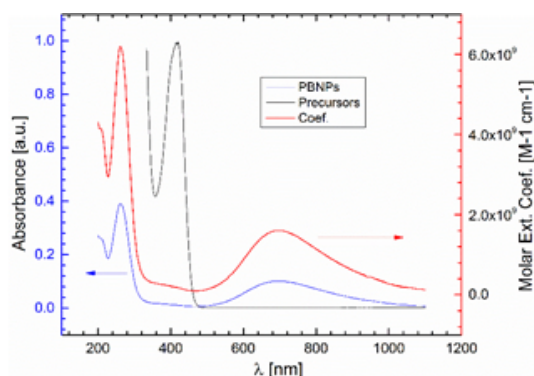


Figura 6.1: Espectros UV-vis de los precursores (negro), PBNPs (azul) y el coef. de extinción molar (rojo).

En la figura anterior se puede observar que los precursores tienen un solo pico de absorción a  $\lambda = 420$  nm, mientras que las PBNPs tienen dos picos, uno ancho a  $\lambda = 700$  nm y otro en la región UV,  $\lambda = 264$  nm. La presencia de estos dos picos es una forma de confirmar la síntesis de las PBNPs según reportó Zhang et al. [256]. Basados en estos resultados se pudo estimar una concentración de PBNPs de 15 ppm/ml ( $15 \times 10^{-3}$  g/l).

La figura 6.2 muestra las imágenes del SEM. Ahí se puede apreciar la estructura cúbica característica de estas nanoestructuras.

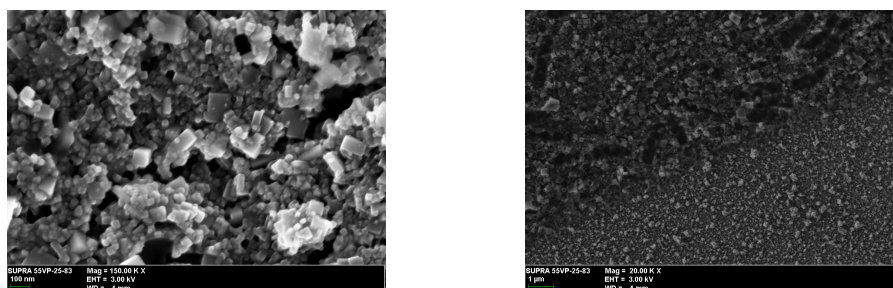


Figura 6.2: Micrografías SEM de las PBNPs. a) PBNPs sobre electrodo de oro, b) PBNPs sobre electrodo de EIROF.

De las micrografías SEM de cinco electrodos se pudo estimar la distribución de tamaños de las PBNPs. Dicha distribución se muestra en la figura 6.3.

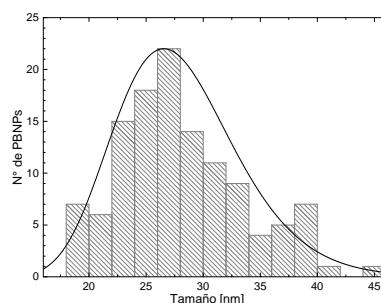


Figura 6.3: Distribución de tamaños de las PBNPs.

### 6.3.2. Voltametría cíclica

Para caracterizar las propiedades de los electrodos con BPNPs (Au + PBNP and Au + EIROF + PBNP), se realizaron mediciones de voltametría cíclica. La figura 6.4 muestran las curvas de los electrodos de Au + PBNPs (A), Au-EIROF (B) y Au-EIROF + PBNPs (C). Dichas mediciones se hicieron en PBS y con 150  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

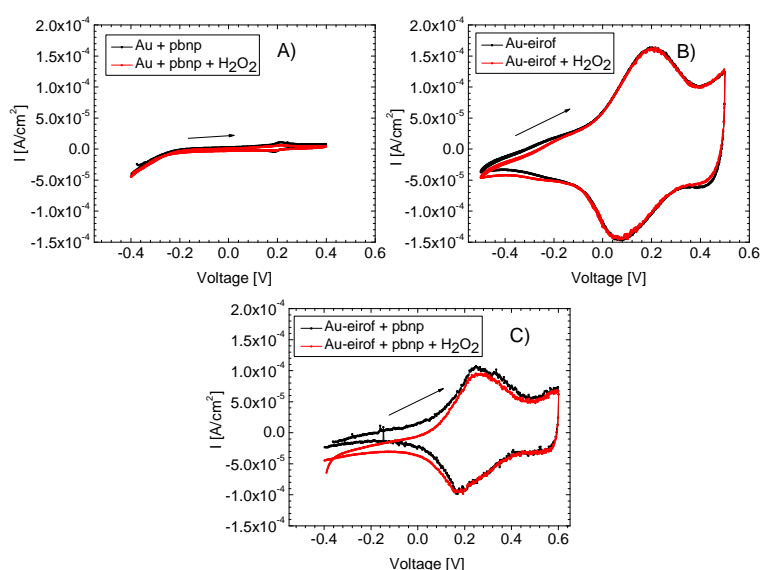


Figura 6.4: Voltagramas de: a) Au + PBNPs b) Au + EIROF h and c) Au + EIROF + PBNPs en presencia de 150  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo) y en negro lo medido en PBS.

El cuadro 6.1 muestra la variación de la carga eléctrica entre las mediciones en PBS y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto se estimó calculando la integral bajo la curva de los picos de oxidación y reducción.

Cuadro 6.1: Variación de la Carga en los tres electrodos

Au+PBNPs		EIROF		EIROF+PBNPs	
Carga (C/cm <sup>2</sup> )	Variación (%)	Carga (C/cm <sup>2</sup> )	Variación (%)	Carga (C/cm <sup>2</sup> )	Variación (%)
Q <sub>1</sub> <sup>ox</sup> : 1.32E <sup>-7</sup>	-82.5	Q <sub>3</sub> <sup>ox</sup> : 2.07E <sup>-5</sup>	0.48	Q <sub>5</sub> <sup>ox</sup> : 1.86E <sup>-5</sup>	-4.82
Q <sub>2</sub> <sup>ox</sup> : 2.30E <sup>-8</sup>		Q <sub>4</sub> <sup>ox</sup> : 2.08E <sup>-5</sup>		Q <sub>6</sub> <sup>ox</sup> : 1.77E <sup>-5</sup>	
Q <sub>1</sub> <sup>red</sup> : 1.93E <sup>-7</sup>	-69.86	Q <sub>3</sub> <sup>red</sup> : 1.87E <sup>-5</sup>	0.53	Q <sub>5</sub> <sup>red</sup> : 1.10E <sup>-5</sup>	17.59
Q <sub>2</sub> <sup>red</sup> : 5.84E <sup>-8</sup>		Q <sub>4</sub> <sup>red</sup> : 1.88E <sup>-5</sup>		Q <sub>6</sub> <sup>red</sup> : 1.30E <sup>-5</sup>	

Donde Q<sub>1</sub> and Q<sub>2</sub> son los cambios en los procesos de oxidación y reducción del electrodo de Au + PBNPs. Q<sub>3</sub> and Q<sub>4</sub> corresponden a los cambios antes mencionados pero del electrodo de EIROF + PBNPs. Por último, Q<sub>5</sub> and Q<sub>6</sub> pertenecen a dichos cambios para el electrodo de EIROF sin PBNPs.

En el cuadro 6.1 se puede apreciar un gran incremento en la carga del electrodo EIROF + PBNPs. Esto se podría deber a la menor resistencia de transfe-

rencia de carga que posee el film de IrOx comparado con el oro. Esto último fue previamente reportado por Mayorga et al. [257].

También se puede notar que para ambos electrodos, en oxidación, hay un decrecimiento de la carga con respecto al CV con  $H_2O_2$ . Este decrecimiento es mayor para el electrodo de Au + PBNPs. El menor cambio observado en el electrodo de EIROF + PBNPs se podría deber al efecto del film nanoestructurado sobre las PBNPs. Parecería que el EIROF facilita la reducción de las PBNPs. El  $H_2O_2$  oxida químicamente a las PBNPs, luego el EIROF facilita su reducción y, por lo tanto, existen más PBNPs disponibles a oxidarse electroquímicamente.

Los resultados del ciclo de reducción muestran que este ciclo está más favorecido en el electrodo de EIROF + PBNPs. Esto se debe observa claramente en la variación positiva de la carga. Esto significa que existe un aumento en la carga involucrada cuando se agrega el  $H_2O_2$ . Además, se puede observar en el proceso de oxidación, que en ambos electrodos con PBNP hay una disminución de las cargas involucradas, con respecto a la respuesta sin  $H_2O_2$ . Esta disminución es mayor para el electrodo Au + PBNPs. El menor cambio observado en el electrodo EIROF + PBNPs podría deberse al efecto de las nanoestructuras de  $IrO_2$  sobre las nanopartículas de PB. Parecería que el EIROF facilitara la reducción de dichas nanopartículas. El  $H_2O_2$  las oxida químicamente, pero en el segundo caso, el EIROF también las reduce, y por lo tanto, en el ciclo de oxidación, hay más PBNPs disponibles para ser oxidadas. Dado que hay más PBNPs reducidas que en el caso del electrodo Au+PBNPs, esto da como resultado una pequeña variación con respecto a las cargas sin la presencia de  $H_2O_2$ . El ciclo de reducción permite verificar aún más esta hipótesis. Se puede observar que la reducción se encuentra más favorecida en el electrodo EIROF + PBNPs, ya que la variación de las cargas en el proceso de reducción es positiva (cuadro 6.1). Eso significa que la cantidad de cargas involucradas aumenta con respecto a las medidas antes de la adición del  $H_2O_2$ .

La figura 6.5 muestra la variación porcentual de la corriente de cada electrodo luego de agregar  $150 \mu M H_2O_2$ .



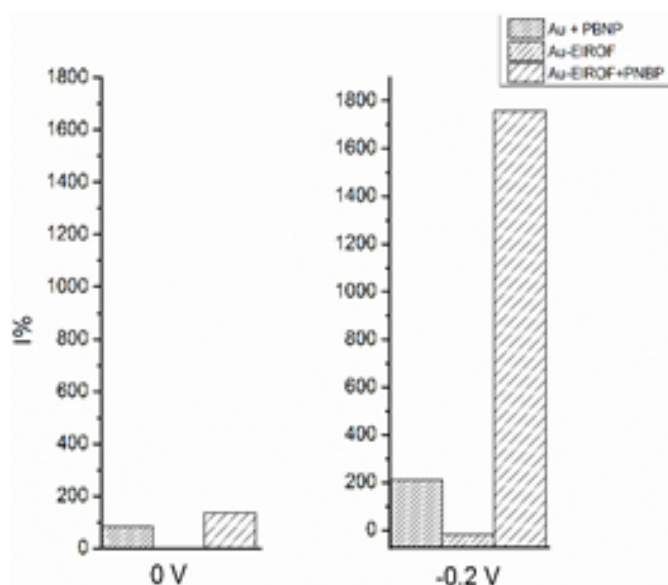


Figura 6.5: Variación de la corriente en porcentaje al agregar  $150 \mu M H_2O_2$

El electrodo de Au-EIROF + PBNP mostró la mayor variación de I% en ambos potenciales. Se puede notar que el electrodo de Au-EIROF no es sensible al  $H_2O_2$  ya que mostró un cambio despreciable. Claramente se observa la mejora producida en la respuesta por las PBNPs y además el mayor cambio se obtuvo con el electrodo modificado con IrOx. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta que el EIROF disminuye en gran medida la resistencia de transferencia de carga de la interfase electrodo - electrolito. Si bien la mejor respuesta se obtuvo a un potencial de  $-0,2 V$ , se eligió polarizar los electrodos a  $0 V$  al momento de realizar las amperometrías para disminuir la posibilidad de detectar interferentes [40].

La figura 6.6 muestra los CV del electrodo de EIROF + PBNPs con dos concentraciones de  $H_2O_2$ .

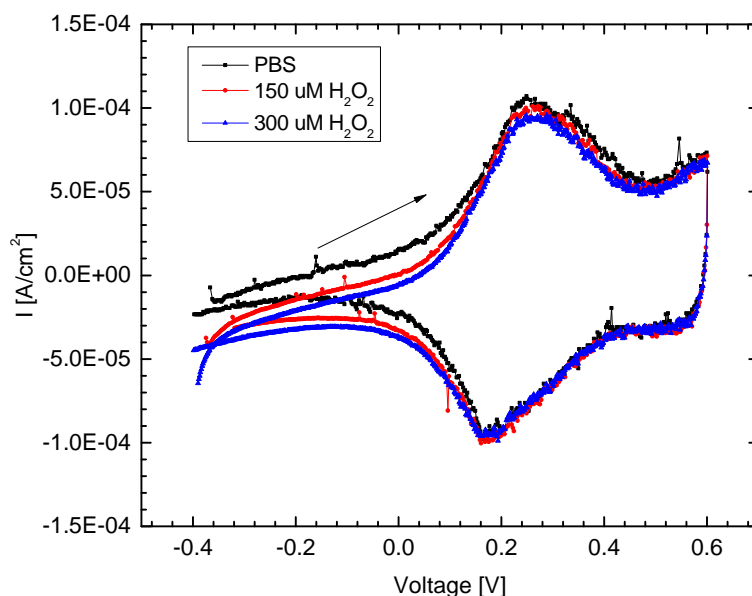


Figura 6.6: Voltagramas de dos concentraciones de  $H_2O_2$ , 150  $\mu M$  (rojo) y 300  $\mu M$  (azul).

### 6.3.3. Impedancia

La figura 6.7 muestra los diagramas de Nyquist de los electrodos evaluados.

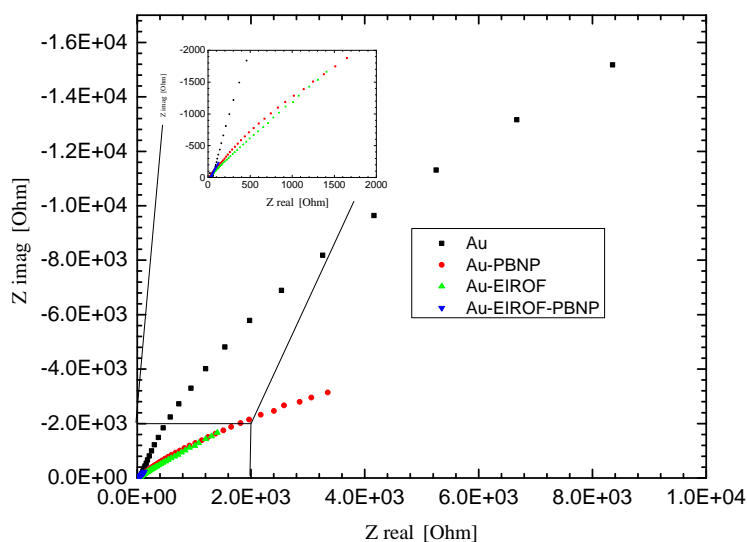


Figura 6.7: Diagrama de Nyquist de los 4 electrodos utilizados. En el recuadro se muestra la respuesta EIS de menores valores.

Se puede notar que el electrodo de oro posee una mayor impedancia de interfase. Ésta decrece significativamente luego de la electrodeposición del  $IrOx$ . Por otro lado, el agregado de las PBNPs provocó una disminución de la impedancia en ambos electrodos. Usando el software Zview 2.9 (Scribner Associates,

Inc.) fue posible hacer un ajuste del sistema, para ellos se usó un circuito RC paralelo. Los resultados se detallan en el cuadro 6.2.

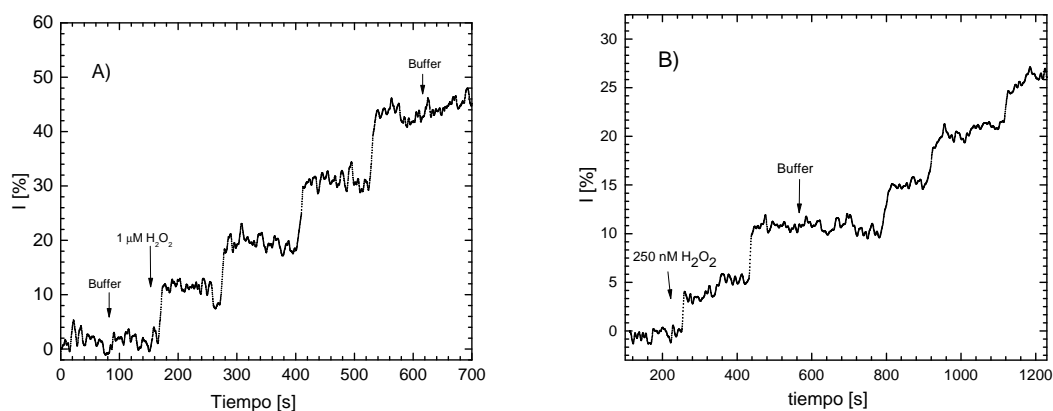
Cuadro 6.2: Valores de los componentes de los circ. equivalentes

Electrodo	$C_{dl}$ (F)	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )
Au	$9.06E^{-5}$	21030
Au+PBNPs	$6.44E^{-5}$	11853
EIROF	$6.31E^{-5}$	628
EIROF+PBNPs	$9.02E^{-6}$	628

El cuadro 6.2 muestra los valores de  $R_{ct}$  and  $C_{dl}$  para cuatro electrodos. Se puede notar que el electrodo de oro tiene la mayor resistencia de transferencia de carga. Al agregarle las PBNPs, dicha resistencia disminuye. En el caso del electrodo de EIROF, el efecto de las PBNPs se ve reflejado en la capacidad. Efectos similares fueron mostrados por Yang et al. [63].

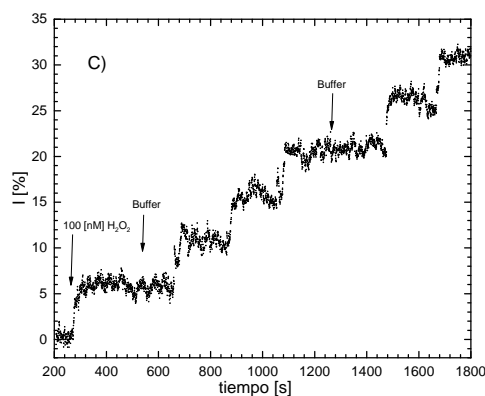
#### 6.3.4. Amperometría

La figura 6.8 muestra la respuesta cronoamperométrica de los electrodos de Au + PBNPs y EIROF + PBNPs. La figura 6.8 (a) muestra la respuesta del electrodo de Au + PBNPs en valores normalizados de la corriente en función del tiempo. Se normaliza calculando el valor porcentual referido al valor sin agregados. Las figuras 6.8 (b) y (c) muestran dicha respuesta pero del electrodo de EIROF + PBNPs y en dos rangos de concentraciones de  $H_2O_2$ .



(a) Respuesta del electrodo Au+PBNPs a agregados de  $1 \mu M$  de  $H_2O_2$ .

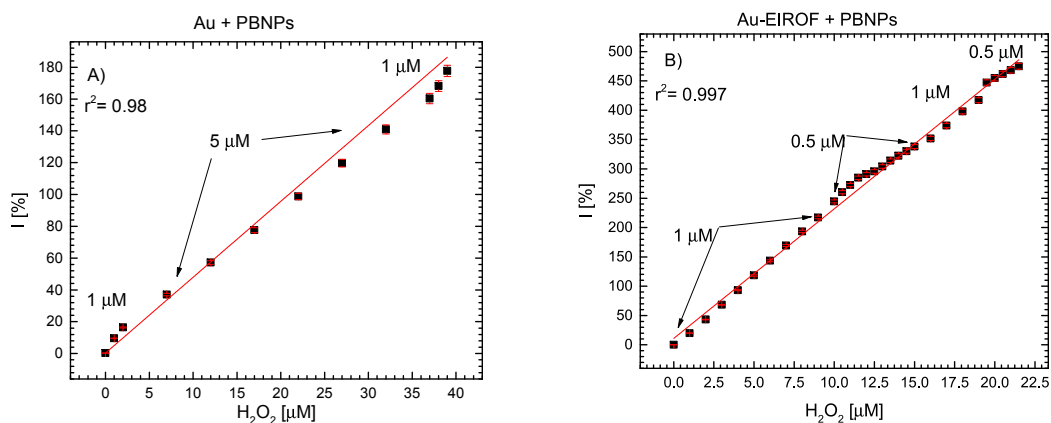
(b) Respuesta del electrodo EIROF+PBNPs a agregados de  $0,25 \mu M$  de  $H_2O_2$ .



(c) Respuesta del electrodo EIROF+PBNPs a agregados de  $0,1 \mu M$  de  $H_2O_2$ .

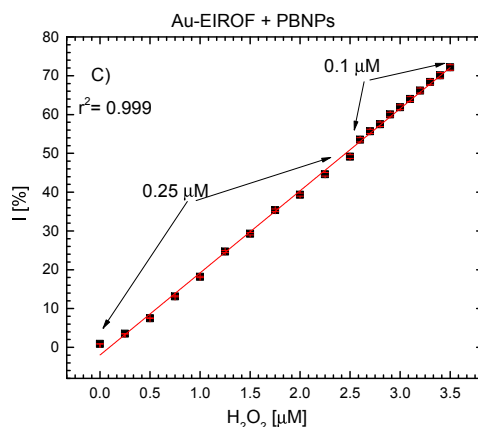
Figura 6.8: Respuesta de los electrodos al  $H_2O_2$ .

Las curvas de calibración de la figura 6.9 muestran que ambos electrodos respondieron de manera lineal en los rangos de concentraciones estudiados. Estas curvas se construyeron haciendo agregados de al menos dos concentraciones diferentes.



(a) Curva de calibración del electrodo Au + PBNPs

(b) Curva de calibración del electrodo EIROF + PBNPs hasta los 23  $\mu M$ .



(c) Curva de calibración del electrodo EIROF + PBNPs hasta los 4  $\mu M$ .

Figura 6.9: Curvas de calibraciones de ambos electrodos.

### 6.3.5. Medición de $H_2O_2$ con impedancia

Para analizar los datos de impedancia se utilizó el PMN, este parámetro indica la tasa de variación de la impedancia en función de la concentración de  $H_2O_2$  agregado, y fue calculado en el rango de 0,1-65000 Hz. Si se observan los resultados obtenidos para el módulo de la impedancia (figuras de la derecha en 6.10 y 6.12) de ambos electrodos, los mayores cambios están en el rango de 0,1-10 Hz lo cual concuerda con el trabajo de [217]. El PMN de la fase (figuras de la derecha en 6.11 y 6.13) también muestra cambios en ese rango de frecuencias pero los mayores se dieron a partir de los 10000 Hz. Mientras menor sea la frecuencia de la impedancia utilizada para realizar la medición, mayor es el

tiempo consumido. Un biosensor impedancimétrico de glucosa puede demorar hasta 20 minutos para realizar una determinación [250]. El sensor aquí estudiado utilizando el  $H_2O_2$ , un producto de la catálisis de glucosa con GOx, presentó cambios de impedancia en varios rangos de frecuencias, pero se destacan los cambios producidos a partir de los 10000 Hz. Por ello se construyeron las curvas de calibración, tanto del módulo como de la fase, tomando una frecuencia de 54100 Hz. Las recta de calibración del módulo se muestran a la izquierda de las figuras 6.10 y 6.12, mientras que las de la fase se encuentran a la izquierda de las figuras 6.11 y 6.13. Si bien todavía no se realizaron mediciones en el tiempo utilizando una frecuencia en particular, estos resultados abren la posibilidad de mediciones más rápidas si se empleara una frecuencia como la de la calibración.

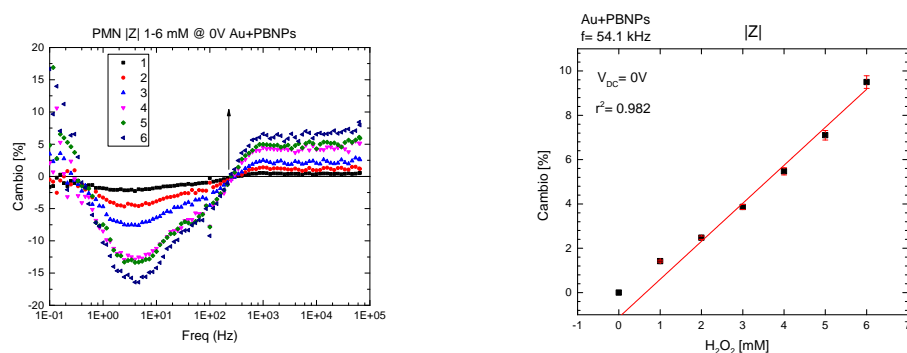


Figura 6.10: Electrodo de oro con PBNPs. Izquierda: PMN del módulo de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para  $f= 54.1$  kHz.

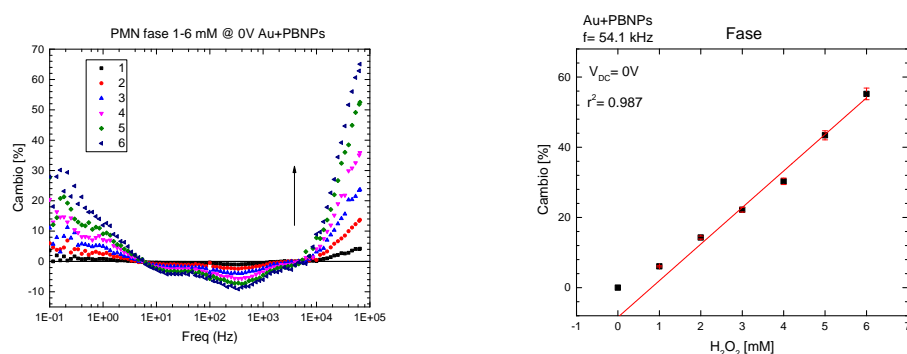


Figura 6.11: Electrodo de oro con PBNPs. Izquierda: PMN de la fase de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para  $f= 54.1$  kHz.

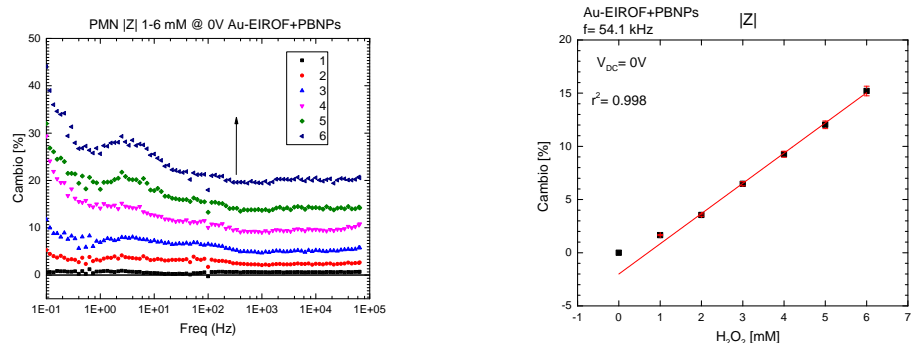


Figura 6.12: Electrodo de EIROF con PBNPs. Izquierda: PMN del módulo de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para  $f = 54.1$  kHz.

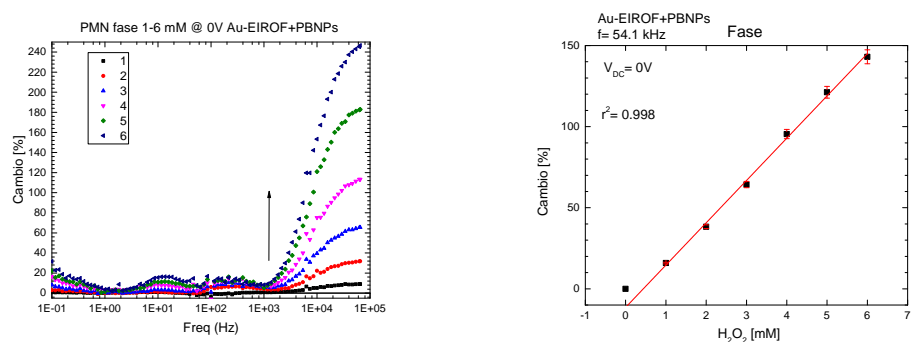


Figura 6.13: Electrodo de EIROF con PBNPs. Izquierda: PMN de la fase de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para  $f = 54.1$  kHz.

### 6.3.6. Comportamiento dinámico

En este trabajo el comportamiento dinámico es la respuesta amperométrica del sensor frente a agregados de una concentración de  $H_2O_2$  seguidos de una medición en solución sin  $H_2O_2$ . Estos resultados nos brindan una idea de la habilidad del sensor para realizar mediciones continuas en el tiempo.

Teniendo en cuenta las distintas sensibilidades del sensor con y sin  $IrO_2$ , las concentraciones de  $H_2O_2$  elegidas fueron de  $10 \mu M$  para el electrodo de Au+PBNPs y de  $1 \mu M$  para el electrodo de Au-EIROF+PBNPs.

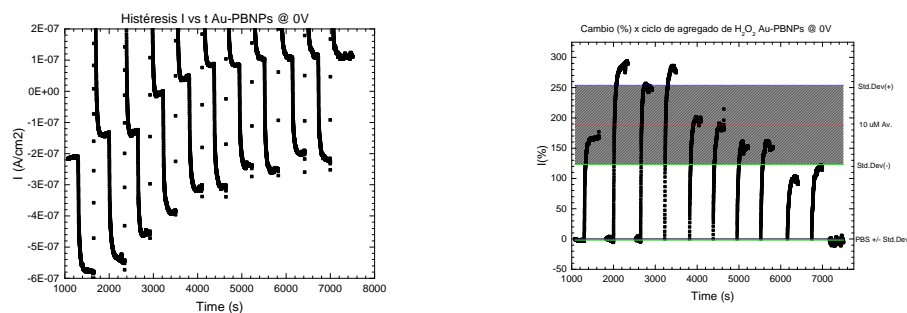


Figura 6.14: Agregados cíclicos de 10  $\mu M$   $H_2O_2$  alternando con PBS. Donde la zona sombreada marca la dispersión alrededor de la respuesta porcentual promedio de los agregados.

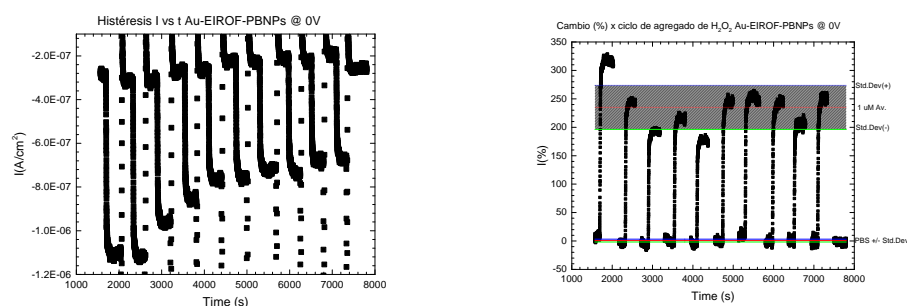


Figura 6.15: Agregados cíclicos de 1  $\mu M$   $H_2O_2$  alternando con PBS. Donde la zona sombreada marca la dispersión alrededor de la respuesta porcentual promedio de los agregados.

Para visualizar mejor la respuesta dinámica porcentual de los electrodos, se la expresó en los siguientes gráficos de barras:

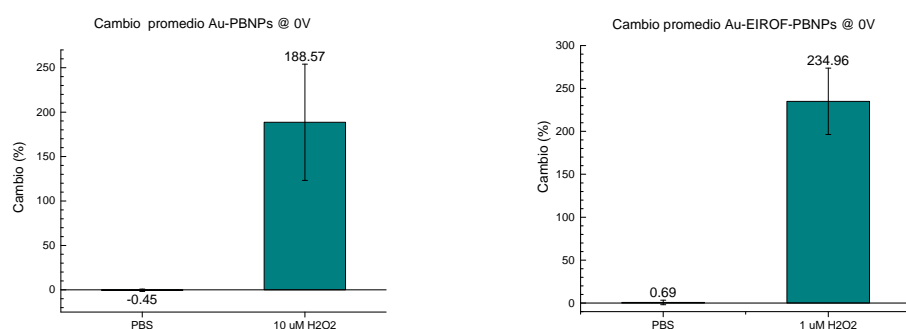


Figura 6.16: Promedio y desviación estándar de la medición en PBS y con  $H_2O_2$  para el electrodo de oro (izquierda) y EIROF (derecha) con PBNPs.

De las figuras anteriores se puede apreciar cómo el electrodo de oro con EIROF presenta una respuesta con menor variación al realizar agregados cíclicos de una misma concentración de  $H_2O_2$ . Estos resultados son un punto de partida para el desarrollo de sensores que se necesiten en lugares fijos como los implantables.



### 6.3.7. Interferentes

El ácido ascórbico es uno de los interferentes más comunes a la hora de determinar el peróxido [40]. Para evaluar la respuesta de nuestro electrodo frente a este interferente, se agregaron  $10 \mu M$  a la celda de medición. La siguiente figura muestra el resultado:

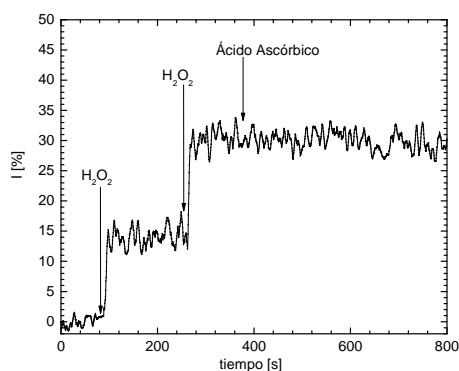


Figura 6.17: Cambio porcentual de la corriente ( $I$  [%]) en función del tiempo al agregar  $1 \mu M$  de  $H_2O_2$  y  $10 \mu M$  de ácido ascórbico (a los 400 [s]).

Como se puede observar, el sensor no presentó cambios frente a la presencia del ácido ascórbico.

## 6.4. Discusión

La figura 6.4 y el cuadro 6.1 muestran las cargas involucradas en los procesos de oxidación y reducción antes y después de agregar  $H_2O_2$ . Se puede notar un gran incremento en la carga del electrodo de EIROF + PBNPs, lo que se puede explicar con la baja resistencia de transferencia de carga que posee el film de IrOx. Esto ya fue reportado en la bibliografía por Mayorga et al. [257].

En el procesos de oxidación se puede observar que ambos electrodos con PBNPs presentan una disminución de la carga involucrada con respecto a la respuesta de la medición sin  $H_2O_2$ . Esta disminución es mayor para el electrodo de Au + PBNPs. El menor cambio presentado por el electrodo de EIROF + PBNPs podría deberse al efecto del IrOx sobre las PBNPs. Parecería que el film de IrOx facilita la reducción de las PBNPs. El  $H_2O_2$  oxida químicamente a las PBNPs, pero el IrOx a su vez favorecen su reducción y, por lo tanto, durante el ciclo de oxidación hay mayor cantidad de PBNPs disponibles a ser oxidadas que en el electrodo de oro.

Durante el ciclo de reducción se puede observar que éste se encuentra más favorecido en el electrodo de EIROF que en el de oro ya que su variación es

positiva. Esto significa que el número de cargas involucradas se incrementa con respecto al medido antes del agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La figura 6.7 y el cuadro 6.2 muestran como las PBNPs mejoraron la transferencia de cargas en el electrodo de oro mediante la reducción de la resistencia de transferencia de carga ( $R_{ct}$ ). Dicha resistencia disminuyó a cerca de la mitad del valor previo. Sin embargo, no se observó tal variación en el electrodo de EIROF. Esto sugiere que al ser el IrOx un buen conductor, la contribución de las PBNPs es despreciable. Cabe mencionar, el valor de  $C_{dl}$  del electrodo de EIROF disminuyó luego de agregadas las PBNPs. Esto se puede interpretar como el agregado de una capacidad en serie por parte de las PBNPs. Por esta razón, el electrodo tiende a comportarse como un electrodo no polarizable, o en otras palabras, tiende a ser menos inerte y oxidable con mayor facilidad [257] [258].

Otros autores reportaron electrodos capaces de detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un potencial de 0 V vs SCE pero sólo obteniendo respuesta a mayores concentraciones. También se usaron otros protocolos experimentales para la obtención de PBNPs. Por ejemplo, Cinti et al. [55] desarrolló un sensor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> basado en PBNPs que funciona a 0 V vs SCE, el cual tiene un LOD de 0,2  $\mu$ M. Este límite es un orden mayor que el desarrollado en esta trabajo. Sheng et al. [44] obtuvo respuesta ante agregados de concentración de 4  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0 V. Li et al. [61], midió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando PB electrodepositado sobre grafeno reducido, polarizando a -50 mV y con agregados de 50  $\mu$ M. En ambos casos, Sheng y Li fabricaron el sensor mediante electrodeposición potenciodinámica, donde los precursores del film de PB se encuentran en solución. Este método presenta la desventaja de ser más lento que el drop-casting. Adicionalmente, el film electrodepositado tiende a desadherirse con el uso y en soluciones neutras y básicas.

El cuadro 6.3 compara los valores de LOD y LOQ obtenidos en este trabajo con la bibliografía. Se puede observar una reducción de dichos valores cercana a dos ordenes de magnitud con una buena relación señal / ruido.

Cuadro 6.3: Tabla 3

Electrodo	Rgo Linear (mM)	Sensibilidad ( $\mu$ A·cm <sup>-2</sup> )	LOD-LOQ ( $\mu$ M)	Potencial (V) vs. RE	Ref.
SPCE-PBNPs	0.02-0.7	164.82	20-	0.15	[259]
Graphite-PBNPs-Nafion	0.021-0.14	138.63	1-	-0.05	[260]
Glassy carbon-RGO-PBNPs	0.0005-0.7	0.1617	1-	-0.05	[261]
Macro porous Au-PBNPs	0.05-11.3	767	-	-0.05	[262]
SPCE-PBNPs	0-4.5	762x10 <sup>3</sup>	0.2-?	0	[55]
Au-PBNPs	0-0.04	6.23x10 <sup>3</sup>	0.16-0.64	0	Este trabajo
EIROF-PBNPs	0-0.022	55.24x10 <sup>3</sup>	0.0084-0.0686	0	Este trabajo

## 6.5. Conclusiones

Se obtuvo un sensor “multi-nanoestructurado” con LOD de  $0,0084 \mu\text{M}$  ( $3\sigma$ ), un LOQ de  $0,0686 \mu\text{M}$  ( $10\sigma$ ) y una sensibilidad de  $55.24 \times 10^3 \mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ . El sensor desarrollado posee un LOD menor comparado con otros trabajos en la bibliografía. Algo importante para remarcar es su fabricación sencilla y su funcionamiento a 0 V. Por otro lado, tanto las mediciones de impedancia como el comportamiento dinámico demostraron el beneficio de emplear la combinación de dos nanoestructuras.

## Capítulo 7

### Films delgados de Prussian Blue

*Einstein se equivocaba cuando decía que "Dios no juega a los dados con el universo". Considerando las hipótesis de los agujeros negros, Dios no solo juega a los dados con el universo: a veces los arroja donde no podemos verlos.*

Stephen Hawking

## 7.1. Introducción

La *Celda-en-un-chip* formada por un arreglo de microelectrodos (ECC MDEA 5037-Pt; ABTECH Scientific, Inc.) fue presentada por Guiseppi-Elie et al. [263] como un transductor fabricado por litografía para aplicaciones biomédicas [264]. Este tipo de fabricación para dispositivos implantables fue descrita por Rahman et al. [265]. Justin et al. realizó la caracterización electroquímica del dispositivo con y sin capas de hidrogeles [266]. Debido a su geometría, este dispositivo cuenta con la ventaja de tener un perfil de difusión radial. Es posible mejorar aún más el funcionamiento haciendo nanoingeniería sobre su superficie. La “nanoingeniería” se refiere al manejo y diseño controlado de la interfase electrodo-electrolito para conseguir el objetivo deseado. Los dispositivos sin modificar fueron caracterizados por cronoamperometría en solución acuosa de ácido monocarboxílico de ferroceno. Estas mediciones fueron ajustadas a simulaciones donde se ve reflejada la difusión radial asociada a este tipo de dispositivo o difusión lineal semi-infinita asociada a electrodos planos. La bondad del ajuste de los dos modelos propuestos demostraron hasta qué punto la geometría del dispositivo posee una geometría del tipo micro-array o planar [267] [263].

Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Anthony Guiseppi-Elie de la Universidad de Texas A&M. En el mismo se modificó la superficie de un dispositivo MDEA 5037 utilizando dos métodos de electrodeposición. El primer método fue denominado potenciodinámico y se electrodepositó. El segundo método se denomina potencioestático. En ambos casos se depositó hexacianoferrato de níquel. El funcionamiento del electrodo fue caracterizado por medio de amperometría, voltametría cíclica y analizando los cambios en la corriente del estado estacionario ( $i_{ss}$ ). La capa nanoestructurada obtenida con el método potencioestático logró una mejora 200 veces mayor al medir la  $i_{ss}$  comparado al electrodo modificado con el método potenciodinámico.

### 7.1.1. Materiales y Métodos

#### 7.1.1.1. Reactivos

El  $\text{FeCl}_2$  y el  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  fueron adquiridos en Sigma-Aldrich®.

La conductividad del agua destilada usada para la preparación de las soluciones fue menor a  $5 \mu\text{S}/\text{m}$ .

### 7.1.1.2. Descripción del Electrodo

Los electrodos empleados fueron micro-transductores de dos canales, donde cada canal es un arreglo tripolar de electrodos de platino. Estos dispositivos se denominan ECC MDEA5037-Pt' (ABTECH Scientific, Inc.), cada uno posee un electrodo de trabajo de platino (WE), una referencia de Ag/AgCl (RE) y el contra electrodo (CE) también de platino. Esta celda fue descrita en detalle por Kotanen et al. [268]. El electrodo al cual denominamos como "E1" se modificó con el método potencioestático, mientras que "E2" se modificó con el método electrodinámico.

### 7.1.1.3. Mediciones electroquímicas

Las mediciones electroquímicas se realizaron con dos potencioestatos. El primero es uno de dos canales e inalámbrico, descrito por Kotanen et al. [269]. El otro es un Solartron 12508W. Las mediciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizaron usando una placa del tipo 96-wells. La voltametría cíclica se realizó entre -0,6 y +0,6 V vs RE. En las mediciones amperométricas, ambos electrodos de WE fueron polarizados a +0,6 V vs la referencia.

**7.1.1.3.1. Cálculos de I en estado estacionario** La corriente del estado estacionario,  $i_{ss}$ , se calculó usando la ecuación para un arreglo de electrodos con múltiples dominios de difusión [268].

$$i_{ss} = 4nFC^*D_{app}r_e \quad (7.1)$$

Donde: n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday,  $D_{app}$  es la difusión aparente,  $C^*$  es la concentración del analito en el seno de la solución y  $r_e$  es el radio de cada microdisco. El área del WE es:  $7.27 \times 10^{-4}$  [cm<sup>2</sup>].

**7.1.1.3.2. Electrodeposición potencioestática** Se mantuvo al electrodo E1 a -400 mV vs RE y sujeto a una inmersión secuencial de cuatro etapas a tiempos controlados. La secuencia se detalla a continuación:

- A) (5s) = 50 mM KCl en 10mM HCl (como solvente ácido),
- B) (50s) = 3.0 mM K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>] + 3.0 mM FeCl<sub>2</sub> disuelto en A,
- C) (50s) = 1.5 mM K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>] + 3.0 mM NiCl<sub>2</sub> disuelto en A y finalmente,

D) (5s) = PBS; pH: 7,2.

Este procedimiento se repitió 5 veces ininterrumpidas. De esta manera se creó capa por capa una estructura de hierro (II,III) hexacianoferrato (II,III) (PB) formadas en B. Luego en C se formó una capa de níquel (II) hexacianoferrato [Ni(II)HCFe].

**7.1.1.3.3. Electrodeposición potenciodinámica** Esta electrodeposición se realizó usando voltametría cíclica en una solución de NiCl<sub>2</sub> 0,5 mM y K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,5 mM en 0.1 M KCl + 0.01 M HCl. Los CVs se hicieron barriendo en potencial a una velocidad de 100 mV/s ente +0,1 y +1,1 V por 30 ciclos. Por último el dispositivo modificado, Pt | NiFeHCF, se lavó con agua destilada.

**7.1.1.3.4. Respuesta amperométrica** Ambos dispositivos fueron evaluados usando dos rangos de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde el menor se encuentra entre 1 y 10 μM y el mayor es de 10 to 100 μM.

## 7.1.2. Resultados

### 7.1.2.1. Voltametría cíclica

La evaluación electroquímica de ambos electrodos reveló un comportamiento completamente distinto de cada electrodo. La siguiente figura muestra los voltagramas en PBS a diferentes velocidades de los electrodos E1 y E2.

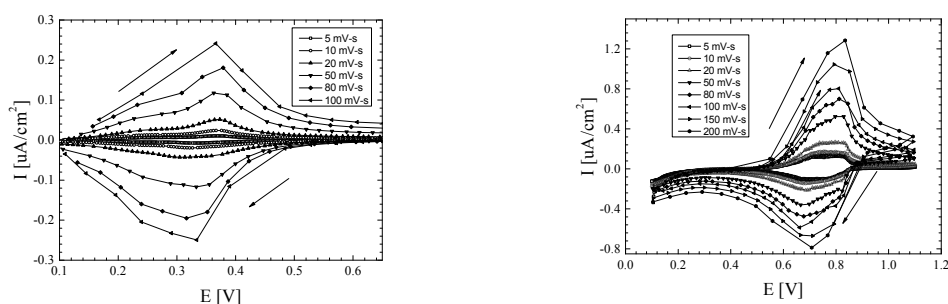


Figura 7.1: Voltametría cíclica de los electrodos E1 (izquierda) y E2 (derecha) en PBS.

### 7.1.2.2. Amperometría

A través de las mediciones amperométricas es posible determinar el posible incremento de la sensibilidad y su relación con ambos métodos de electrodeposición. La figura 7.2 se puede ver la evaluación de dos rangos de concentra-

ciones, uno entre 1-10  $\mu\text{M}$  y el otro 10-100  $\mu\text{M}$  al medirlos con un electrodo de platino sin PB. Las curvas de calibración del electrodo de platino para ambos rangos se pueden observar en la figura 7.3

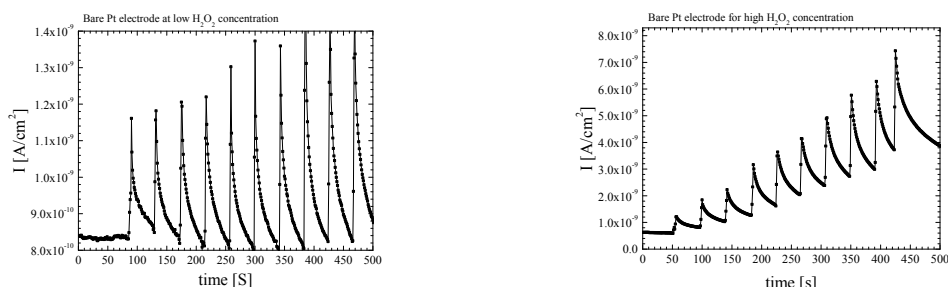


Figura 7.2: Mediciones amperométricas del electrodo de Pt para ambos rangos de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

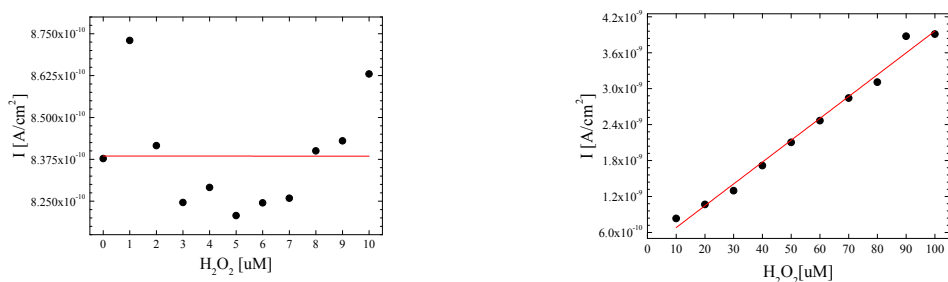


Figura 7.3: Curvas de calibración del electrodo de Pt para ambos rangos de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Se puede ver que el electrodo de platino no es sensible al  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando se mide en el rango de menor concentración. Sin embargo, al medir el rango mayor posee una respuesta lineal con un coeficiente de correlación de 0.9899.

Los electrodos con PB electrodepositado con ambos métodos fueron evaluados en los mismos rangos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La figura 7.4 muestra la respuesta en el tiempo y la figura 7.5 la respectivas calibraciones del electrodo E1.

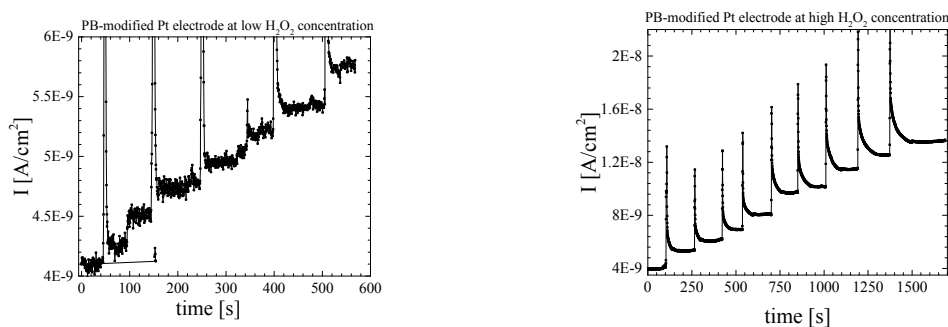


Figura 7.4: Respuesta de la corriente en el tiempo del electrodo E1 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



A partir de los valores estacionarios de la gráfica 7.4, se grafican las curvas de calibración siguientes. No se consideran los picos observados en las gráficas de la figura 7.4 ya que corresponden a transitorios debidos al momento en el que el electrodo se cambia de cubeta de medición.

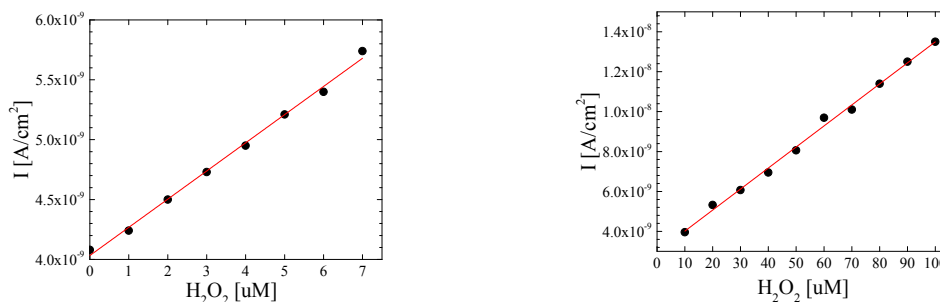


Figura 7.5: Curvas de calibración del electrodo E1 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de  $H_2O_2$ .

Se evidencia claramente el incremento de la respuesta en el rango bajo debido a la presencia del film nanoestructurado de PB.

Las figuras 7.6 y 7.7 muestran la respues del electrodo E2

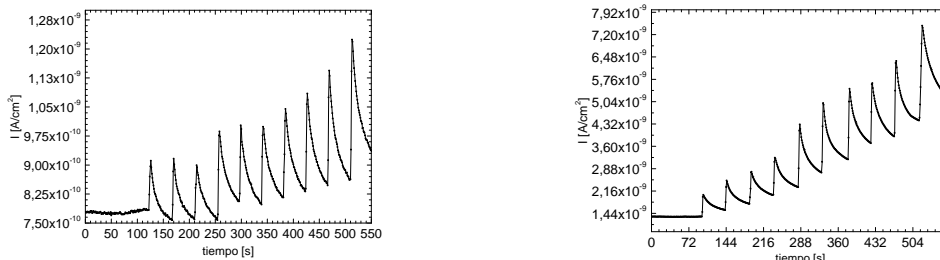


Figura 7.6: Respuesta de la corriente en el tiempo del electrodo E2 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de  $H_2O_2$ .

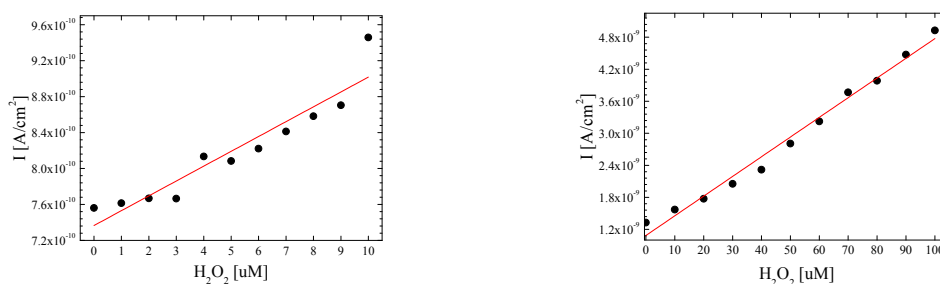


Figura 7.7: Curvas de calibración del electrodo E2 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de  $H_2O_2$ .

El cuadro 7.1 resume las sensibilidades de cada electrodo al  $H_2O_2$ .

Electrodo	Rgo. Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$r^2$
Pt bare	1-10	-	-
Pt bare	10-100	0.05	0.985
E1	1-10	0.333	0.995
E1	10-100	13.16	0.999
E2	1-10	0.024	0.910
E2	10-100	0.05	0.995

Cuadro 7.1: Sensibilidades de los electrodos de Pt, E1 y E2

### 7.1.2.3. Corriente en Estado Estacional ( $i_{ss}$ )

La figura 7.8 presenta la corriente en estado estacionario obtenida con ambos electrodos para los dos rangos medidos.

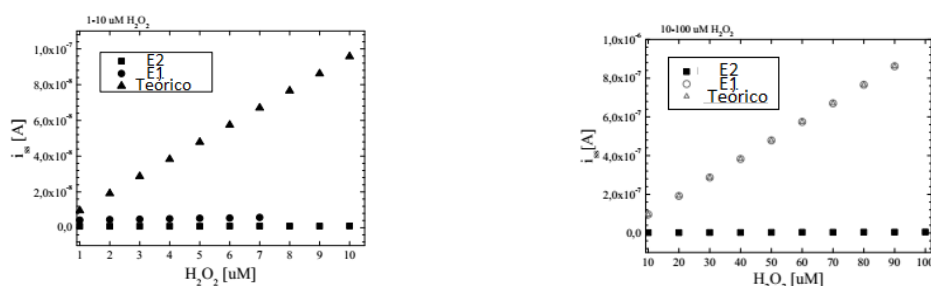


Figura 7.8:  $i_{ss}$  de ambos electrodos para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En ambas figuras se puede observar que el electrodo modificado con el método potencioestático se asemeja más al cálculo teórico de  $i_{ss}$  que el modificado con el método potenciodinámico.

### 7.1.3. Discusión

La evaluación electroquímica reveló un comportamiento completamente distinto entre ambos electrodos. Se puede ver que el potencial redox es diferente en ambos casos. La figura 7.1 muestra un pico de oxidación alrededor de los 0,35 V en el electrodo modificado potencioestáticamente, mientras que ese pico está aproximadamente en 0,75 V en el electrodo modificado potenciodinámicamente. El método de electrodeposición de PB claramente determina la habilidad del PB de cambiar a sus distintos estados de oxidación. Karyakin et al. reportó que

el PB existe como un policristal azul inorgánico [270]. Al moverse hacia potenciales catódicos, se reduce y decolora formando Prussian White (PW). Mientras que a potenciales anódicos, se convierte en Prussian Green. Los voltagramas de la figura 7.1 indicarían un comportamiento del tipo antes descrito.

Las mediciones amperométricas mostradas en las figuras 7.2 y 7.3 evidencian que el electrodo de platino no es sensible dentro del rango bajo de concentración. La electrodeposición de PB claramente mejora la sensibilidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Con el electrodo E1 se obtuvo una sensibilidad de 0,333 y con el E2, la sensibilidad obtenida fue de  $0,024 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Las capas de PB depositadas potencioestáticamente probaron ser mejores para aumentar la sensibilidad del dispositivo. Esta mejora se dio en ambos rangos. En el rango alto, con el método potencioestático se obtuvieron corrientes dos órdenes de magnitud más grande que el potenciodinámico.

La presencia del  $\text{Ni}^{2+}$  ayuda a la estabilidad de la capa de PB en pH alcalinos como lo mostró Ivekovic et al. en su trabajo [271]. Ambos electrodos comparten esta característica, por lo cual la diferencia de la sensibilidad se debe básicamente a la presencia del hierro en estado ferroso.

La corriente estacionaria es un parámetro útil que se puede utilizar para evaluar la respuesta de los films depositados con distintos métodos. La corriente medida con el electrodo E1 son mayores que las del E2. La ecuación 7.1 describe el valor teórico que tomaría  $i_{ss}$  para un valor particular de concentración, por lo tanto, asume que el dispositivo es sensible al analito. En nuestro caso, para el rango bajo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los valores experimentales no se ajustan a los cálculos teóricos. Esto podría deberse a que la teoría no toma en cuenta la variación de la sensibilidad del sistema ante distintos rangos de medición. Por otro lado, el electrodo modificado potencioestáticamente obtuvo valores experimentales que siguen los teóricos dentro del rango alto de concentración.

#### 7.1.4. Conclusiones

Se utilizaron dos métodos de electrodeposición para modificar la superficie del dispositivo MDEA. Como resultado de esto, se obtuvieron dos tipos de films nanoestructurados. El potencioestático generó un film de Hierro-níquel hexacianoferrato y el potenciodinámico generó un film de níquel hexacianoferrato. El primer método mostró una sensibilidad 200 veces mayor que el segundo para la detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aún más, el método potencioestático fue capaz de obtener valores de  $i_{ss}$  tales que pudieron seguir los cálculos teóricos dentro del rango

alto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se puede inferir de estos resultados que la presencia del hierro en estado ferroso mejoró la respuesta del sensor al  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Capítulo 8

# Evaluación del elemento de biorreconomiento para detección de HLB

*La raza humana necesita un desafío intelectual. Debe ser aburrido ser Dios y no tener nada que descubrir.*

Stephen Hawking

## 8.1. Introducción

Los compuestos fenólicos, generados como metabolitos secundarios de las plantas, se encuentran ampliamente distribuidos y se los pueden encontrar en comidas y bebidas de origen vegetal [272]. A pesar de existir más de 6000 estructuras diferentes, hay ciertas estructuras comúnmente encontradas en alimentos, que se podrían dividir en tres grandes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos [273]. Estos compuestos son de elevado interés por sus beneficios para la salud (la mayoría de los antioxidantes de origen vegetal son polifenoles, es decir, compuestos fenólicos que tienen más de un grupo fenol por molécula). Los mismos pueden atrapar radicales libres [274], actuar como agentes quelantes de metales [275], inhibir la oxidación de lipoproteínas [276], o también presentar propiedades benéficas para la salud humana relacionadas con la prevención a la oxidación [277], inflamación [278] y del cáncer [279]. En la bibliografía se pueden encontrar distintos métodos de separación, detección y cuantificación de polifenoles como la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con absorción de luz UV-visible [280], quimioluminiscencia [281], fluorescencia [273], Cromatografía de capa delgada (TLC) combinada con reveladores químicos como el NP (Natural Products) y luz UV [282], pero el utilizado más ampliamente es el método de Folin-Ciocalteu. Por otro lado, se ha reportado también el uso de biosensores para la determinación de polifenoles. Los mismos son dispositivos que emplean transductores físicos y moléculas biológicas que sirven de elemento de biorreconocimiento específico del analito a detectar. Los biosensores reportados para polifenoles utilizan en general la enzima Peroxidasa de Rábano (HRP) [283] [284] [285] [286], aunque otra enzima también utilizada es la Tirosinasa [287]. Se usan también mezclas de enzimas, donde se inmovilizan Lacasa y Tirosinasa [288]. La mayoría de los biosensores para polifenoles inmovilizan el elemento de biorreconocimiento, y emplean el tipo de transducción electroquímica donde la amperometría es la técnica más ampliamente utilizada. Los biosensores tienen algunas ventajas sobre otros métodos, las que incluyen una rápida respuesta, mayor sensibilidad, simplicidad en el uso y un mínimo pretratamiento de la muestra por parte del operador. Los polifenoles se utilizan como marcadores en estudios taxonómicos [289]. Se podrían pensar también que tienen un gran potencial como marcadores de algunas enfermedades en plantas, ya que muestran distintas relaciones de concentración específicas para alguna infección en particular, llegándose a obtener variaciones de entre 150 % y 500 % [290] para algunas enfermedades. Dentro de los po-

lifenoles encontramos un grupo particular que son los flavonoides. Una de las funciones más importantes de estos compuestos es su papel en la protección de la planta frente a invasiones microbianas. Poseen la habilidad de impedir la germinación de esporas y actúan frente a estrés abiótico (radiación UV-B, calor) y mantienen el equilibrio redox en las células [29]. Los flavonoides se transportan al sitio de la infección e inducen una reacción de hipersensibilidad, que es el mecanismo de defensa más temprano empleado por las plantas enfermas, y también la muerte celular programada [30].

En esta tesis y basado en el estudio bibliográfico, evaluaciones y desarrollos presentados en los capítulos previos, se idearon el diseño y evaluación de un biosensor nanoestructurado para la determinación de flavonoides en extractos de plantas. Este biosensor se evaluó principalmente para desarrollar un método de detección temprana de la enfermedad HLB.

## 8.2. Materiales y Métodos

### 8.2.1. Material vegetal

Las muestras fueron recolectadas a partir de plantas sanas de 4 años de edad crecidas en invernaderos certificados de la EEAOC. Los extractos vegetales se hicieron a partir de tallos y hojas jóvenes de *Citrus limón* y *Citrus sinensis*. Las muestras fueron molidas en nitrógeno líquido y se hicieron extractos usando metanol al 80 % a una proporción de 1g de tejido vegetal en 10 ml de solvente.

### 8.2.2. Efectos sobre la actividad de la enzima HRP.

La enzima empleada es la Peroxidasa de Rábano (HRP) tipo VI de *Amoracia rusticana* 250-330 Unidades/mg. Para las determinaciones se utilizó buffer fosfato de sodio y potasio (PBS) a pH 7; peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en una concentración de 28 [ $\mu$ M]; como indicador colorigénico O-Dianisidinadiclora (Sigma Aldrich) disuelta en agua Mili-Q (18 M $\Omega$ ). Los polifenoles puros (flavonoides) usados fueron Naringenina (flavanona), Hesperidina (flavanona glicosilada) y Quercetina (flavonol) (Aldrich).

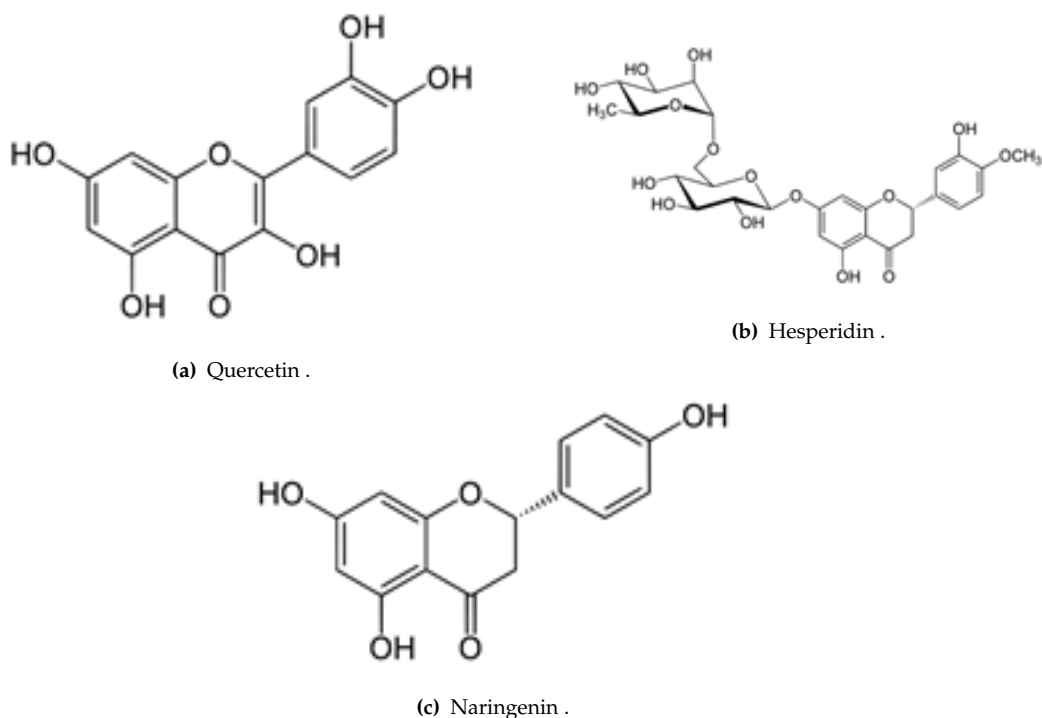
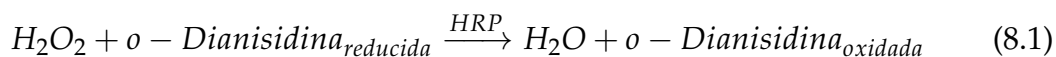


Figura 8.1: Flavonoides empleados en el estudio de la HRP.

Todos los reactivos se conservaron a 4 °C y los extractos en freezer. Las evaluaciones de la cinética de la enzima se hicieron por determinación de la absorbancia a una longitud de onda  $\lambda = 507$  nm usando el método de la o-Dianisidina (o-D) [291], con un espectrofotómetro Beckman DV 7500.

La ecuación 8.1 muestra la síntesis de la formación de color por el método de la o-D y la ecuación 8.2 cómo se hace el cálculo del porcentaje de inhibición enzimática.



$$\% \text{ de Inhibicion} = \left( \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \cdot 100 \quad (8.2)$$

### 8.2.3. Determinación de Fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando



complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo este color proporcional al número de grupos hidroxilos de la molécula. Los resultados de este método se expresan en mg equivalente de ácido gálico (GAE).

#### **8.2.4. Inhibición de la HRP por los flavonoides puros**

Para la caracterización del comportamiento de la enzima en presencia de flavonoides se estudió la cinética de la HRP determinando la formación de producto ( $\lambda = 507$  nm) en el tiempo a distintas concentraciones de cada flavonoide puro. Las lecturas se realizaron a 30 °C, cada minuto durante 20 minutos. Se consideró solo el comportamiento de la enzima en condiciones de velocidad inicial, o sea cuando la formación de producto en el tiempo es constante. Para verificar que existe un efecto de inhibición de los flavonoides sobre la enzima, se hicieron pruebas incubando cada flavonoide con  $H_2O_2$  a distintos tiempos. El control se lleva a cabo en ausencia de flavonoides, y los tiempos de incubación se hicieron a 0, 2, 5, 10 y 20 minutos. Se evaluó el efecto de los compuestos presentes en las muestras vegetales, sobre la enzima HRP, agregando 20  $\mu$ l de extracto metanólico al reactivo de trabajo. Como control se agregó 20  $\mu$ l de metanol 80 % al reactivo de trabajo.

#### **8.2.5. Inhibición enzimática en presencia de extractos vegetales**

Las muestras fueron recolectadas a partir de plantas sanas de 4 años de edad crecidas en invernaderos certificados de la EEAOC. Los extractos vegetales se hicieron a partir de tallos y hojas jóvenes de Citrus limón y Citrus sinensis. Las muestras fueron molidas en nitrógeno líquido y se hicieron extractos usando metanol al 80 % a una proporción de 1g de tejido vegetal en 10 ml de solvente. Se evaluó el efecto de los compuestos presentes en las muestras vegetales, sobre la enzima HRP, agregando 20  $\mu$ l de extracto metanólico crudo al reactivo de trabajo. Como control se agregaron 20  $\mu$ l de metanol 80 % al reactivo de trabajo. Además se realizaron mediciones en extractos de hojas agregando por separado quercetina y hesperidina, 467 % y 154 %, respecto a las concentraciones basales determinadas por HPLC. Dichos aumentos en los niveles de ambos flavonoides fueron observados en plantas de citrus enfermas dentro de los 12 meses de la

inoculación del patógeno.

### 8.3. Resultados

En las figuras 8.2 (a) y (b) se muestra la cantidad de polifenoles totales por g de peso fresco de tallos y hojas de limón y naranja.

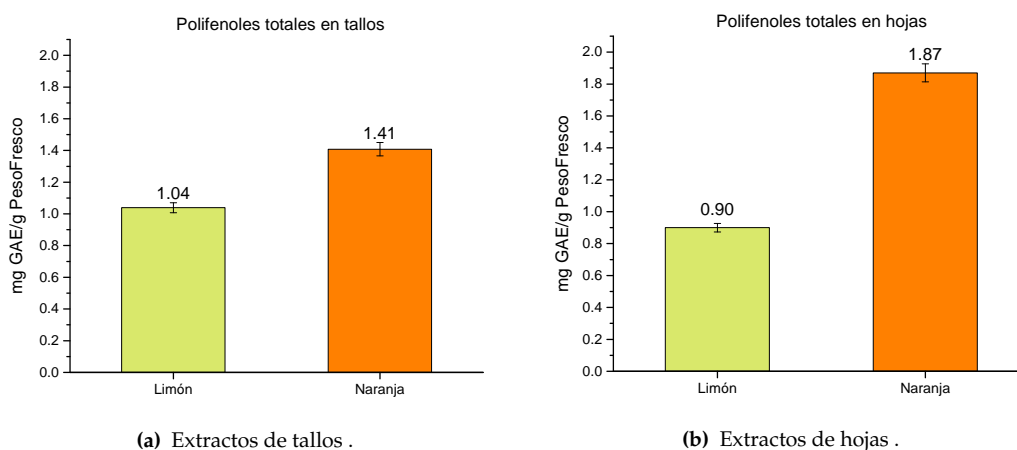


Figura 8.2: Cuantificación de fenoles totales por Folin-Ciocalteu.

A continuación se presenta la disminución en la velocidad de la reacción enzimática, o inhibición de la HRP, debido a la presencia de distintas concentraciones de Naringenin, Hesperidin y Quercetin para una misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

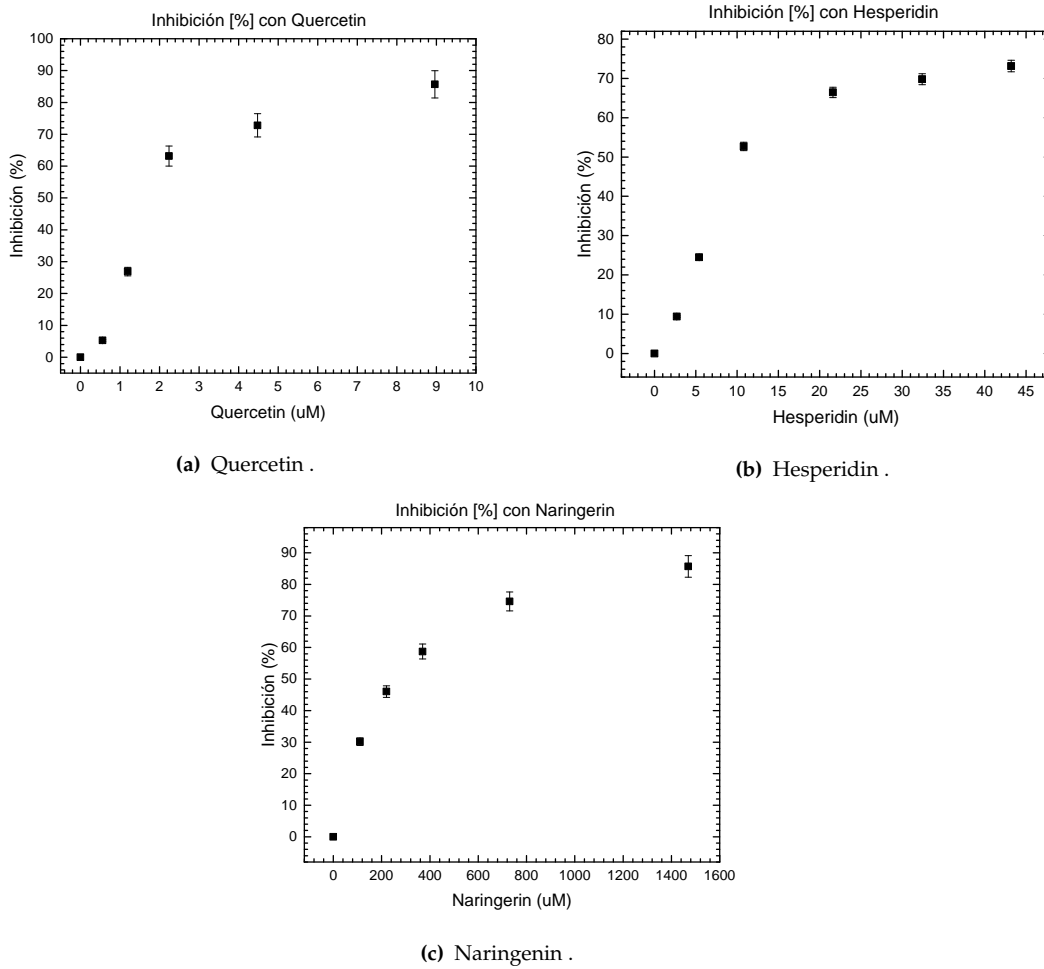


Figura 8.3: Grado de inhibición de la HRP vs. concentración de flavonoide.

La figura 8.4 muestra inhibición enzimática cuando se utilizan extractos de tallos de limón y naranja. El control se hizo empleando el mismo volumen de metanol 80 %.

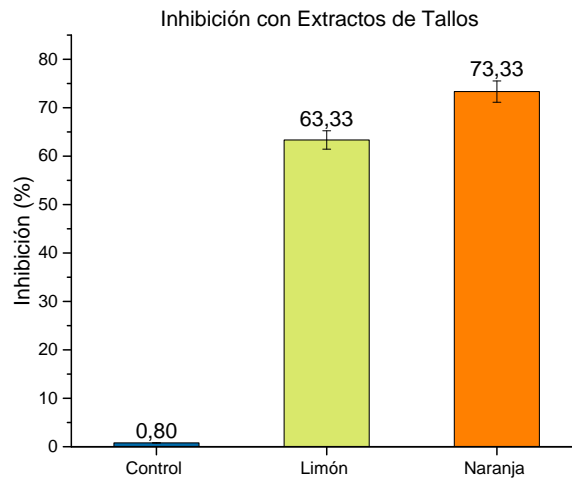


Figura 8.4: Disminución de la actividad enzimática debido a la presencia de polifenoles totales en tallos de plantas de limones y naranjas.

En la siguiente figura se observan los perfiles cromatográficos de los extractos donde se resalta la presencia del hesperidin (H) y quercetin (Q). Es posible observar una mayor presencia de hesperidin en el extracto de naranja.

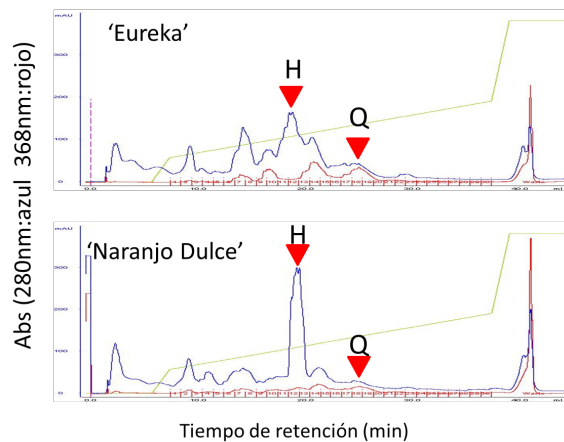


Figura 8.5: Perfiles cromatográficos de extractos de hojas de plantas de limon y naranja.

En la figura 8.6 se muestra la variación promedio de tres ensayos de la actividad de la HRP cuando, a una misma concentración de  $H_2O_2$  ( $0,28 \mu M$ ), se incuba durante distintos tiempos con Neringenin ( $0,2 \text{ mM}$ ), Quercetin ( $5 \mu M$ ) y Hesperidin ( $11 \mu M$ ).

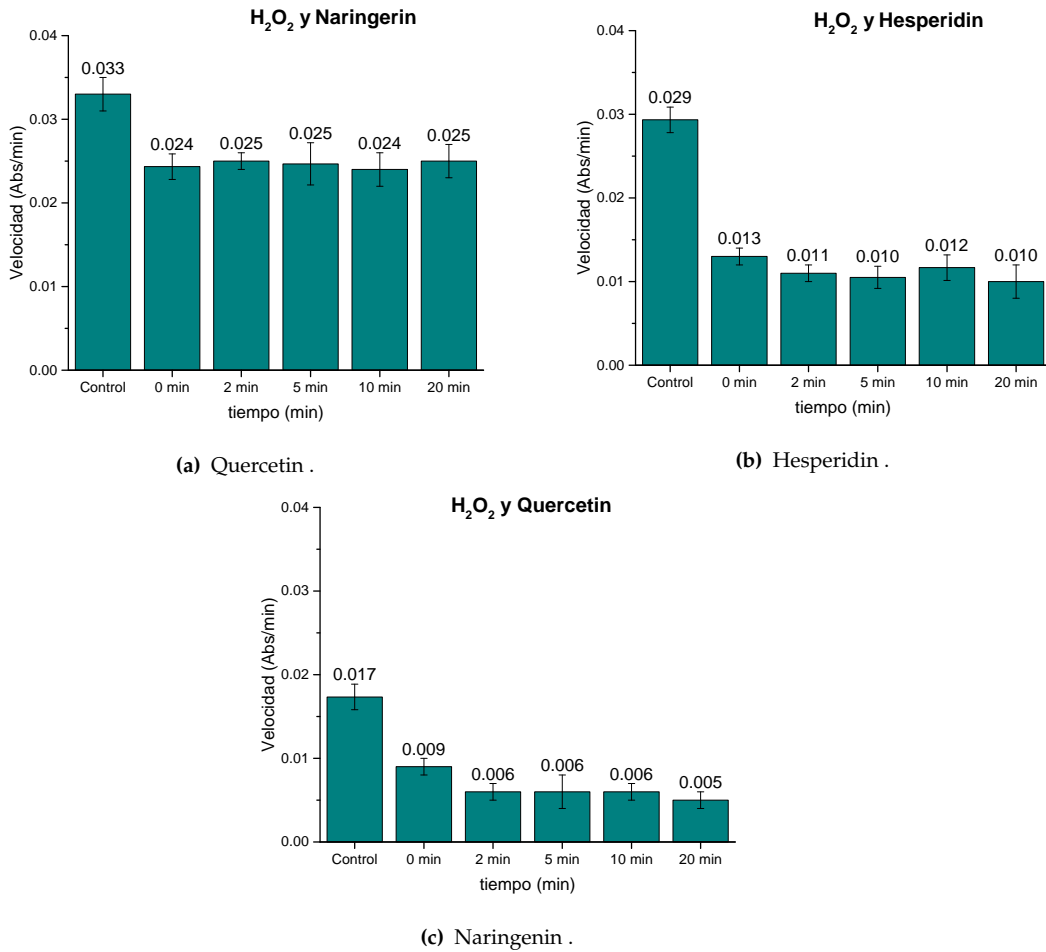


Figura 8.6: Cambios en la actividad de la HRP cuando se incubaba a distintos tiempos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con Quercetin, Herpsridin y Naringenin.

La siguiente figura muestra la inhibición enzimática promedio de tres mediciones con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,28 μM) junto con extractos de hojas de naranja (Nar) y limón (Lim), los cuales se incubaron durante tres tiempos distintos junto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

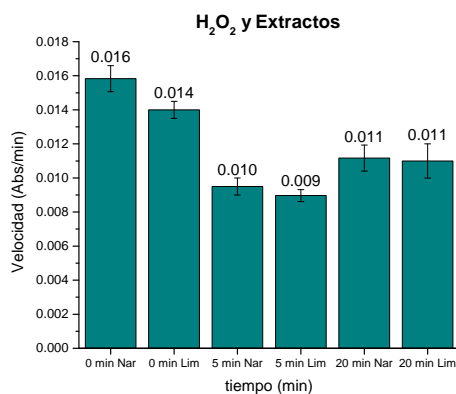


Figura 8.7: Cambios en la actividad de la HRP cuando se incubaba a distintos tiempos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con extractos reales de hojas de Naranja y Limón.

En la figura 8.8 se observan los cambios de la actividad para agregados de extractos de limón, naranja y los mismos extractos donde además se pone, por separado, flavonoides puros en los porcentajes descritos en el punto 8.2.5. Esto permitirá comprobar si el incremento de los flavonoides por enfermedad sería detectable con este sistema para el diseño del biosensor.

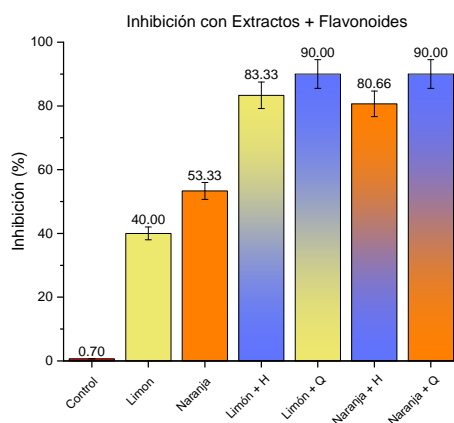


Figura 8.8: Inhibición enzimática con extractos reales y agregados artificiales de los flavonoides.

### 8.3.1. Respuesta del biosensor a la infección con *Xanthomona Campetris*

Dado que las plantas enfermas con HLB presentan valores elevados de polifenoles, lo cual genera un aumento en la inhibición de la HRP, se buscó evaluar la respuesta enzimática frente a una enfermedad presente en nuestra localidad. Para ello se midió la actividad enzimática usando extractos de plantas de la variedad Pinneapple, sanas y 7 días luego de realizada la inoculación.

Como se puede observar en la figura 8.9, los compuestos polifenólicos en plantas enfermas con cancrrosis disminuyen al contrario de lo que sucede en el HLB. Esto pudo ser comprobado tanto por nuestra técnica de referencia como por la inhibición enzimática.

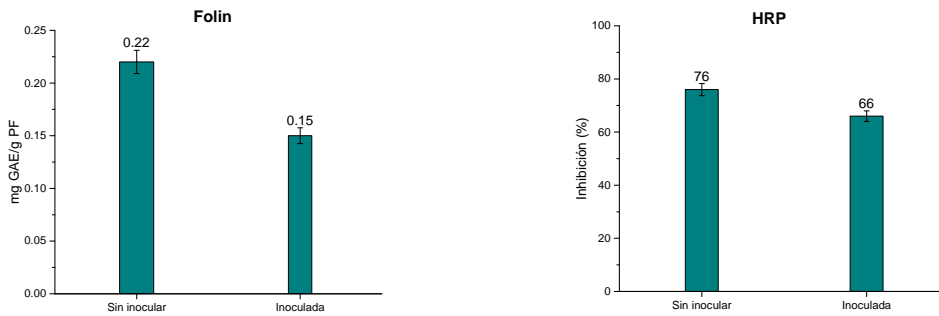


Figura 8.9: Evaluación de extractos de una planta sana y enferma con cancrrosis.

La figura 8.9 muestra los resultados de inhibición obtenidos con el método de referencia (izquierda) y a la derecha, los resultados obtenidos con el método de inhibición enzimática propuesto en esta tesis. Se puede observar que el método propuesto permite detectar entre muestras inoculadas y sin inocular.

### 8.3.2. Respuesta del biosensor a la infección con HLB

Como Argentina es un país libre de HLB al momento de la redacción de este trabajo, la evaluación del biosensor en plantas infectadas con HLB se la realizó en el Instituto Agronómico Centro de Citricultura Sylvio Moreira en Araras, Brasil.

Para esta prueba se utilizaron plantas de Naranja Valencia en invernadero. Se tomaron muestras de 3 plantas sanas y 3 plantas sintomáticas de un año a partir de su infección, tomando 2 hojas de cada punto cardinal de cada planta. Luego se cortaron discos de cada hoja para realizar un pool de muestra. Estos discos se pesaron hasta completar 1 g de peso fresco y se realizó la extracción utilizando etanol 96. Para los ensayos de inhibición se evaluaron 4 tiempos, 5, 10, 30 y 45 minutos.



Figura 8.10: Hojas recolectadas de plantas sanas.



Figura 8.11: Hojas recolectadas de plantas a un año de haberse infectado con HLB.

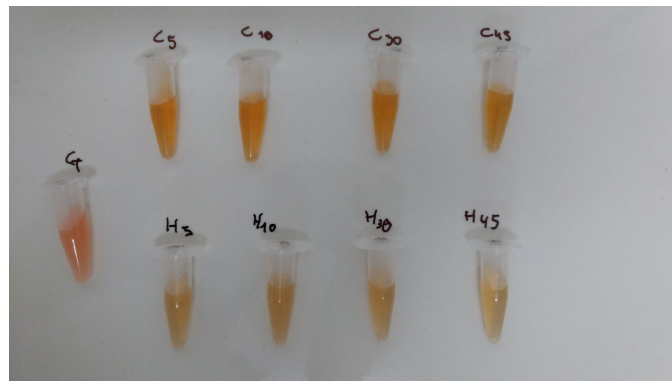


Figura 8.12: Ensayo con plantas sanas y con HLB. Al extremo izquierdo se puede observar el tubo control sin extracto. La fila superior corresponde a los extractos de planta sana y la inferior a la infectada con HLB. De izquierda a derecha se encuentran los tiempos de extracción, 5, 10, 30 y 45 minutos respectivamente.

A partir de estos resultados preliminares se pueden apreciar resultados muy promisorios. Incluso en tiempos de extracción tan cortos como 5 minutos el biosensor puede diferenciar entre plantas sanas e infectadas con HLB.

#### 8.4. Evaluación del proceso de extracción en la respuesta del biosensor

La aplicación exitosa del biosensor en el campo depende del método de extracción elegido. Para lograr buenos resultados es necesario que la extracción del compuesto deseado sea cuantitativa y reproducible, y en el menor tiempo y para tener en cuenta la portabilidad del método. Para evaluar la aplicación en campo del biosensor, se probaron distintos tiempos de extracción asistida con



un baño ultrasónico y en tres solventes: agua destilada, etanol 96 y metanol al 80%. Los tiempos de extracción ultrasónica fueron 5, 10 y 15 minutos. Luego de cada tiempo los extractos se filtraron para obtener el extracto sin la porción vegetal. Como se expuso anteriormente se hizo un pool con cada muestra y se peso 1 g de peso fresco para cada extracción. Cada extracto se hizo por triplicado. La siguiente figura muestra el proceso. De las mediciones del método Folin-Ciocalteau (figuras 8.14 y 8.15) se observa que si bien la extracción con etanol 96° es menor que con metanol, es decir, la eficiencia es menor, tanto el método de extracción como el tiempo evaluado, alcanzarían para observar diferencias significativas entre las muestras (figuras 8.14 y 8.15 a la derecha).



Figura 8.13: Descripción gráfica del proceso de extracción rápida.

Luego, se comparó la inhibición enzimática de cada tiempo de extracción con la técnica Folin. A continuación están los resultados para 10 y 15 minutos de extracción obtenidos de dicha comparación:

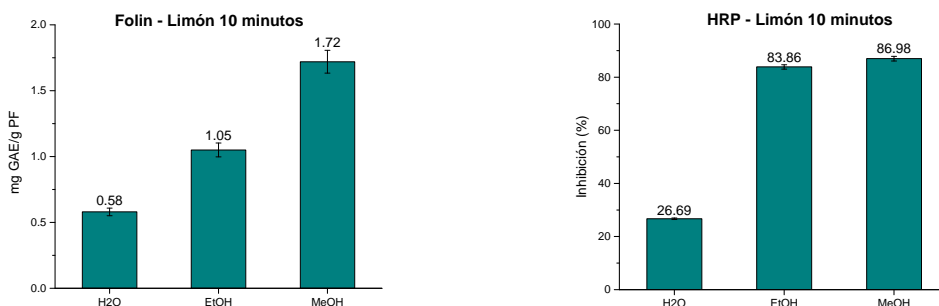


Figura 8.14: Extracción de 10 minutos de hojas de Limón.

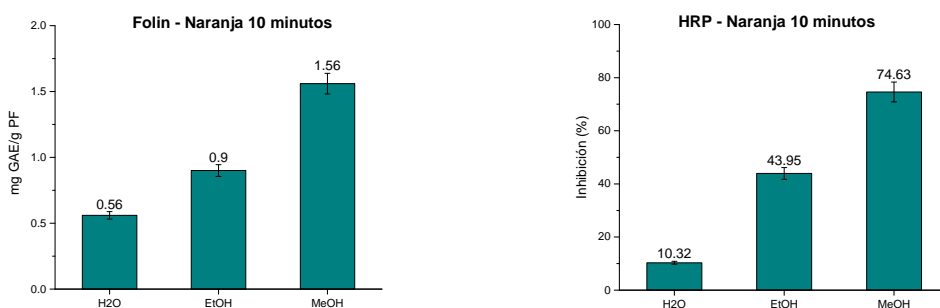


Figura 8.15: Extracción de 10 minutos de hojas de Limón.

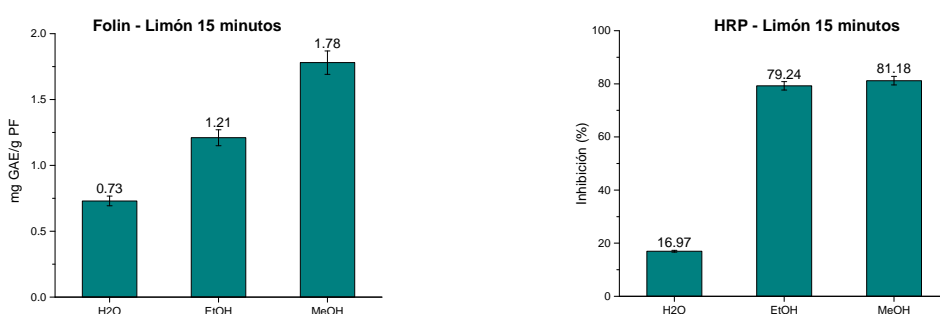


Figura 8.16: Extracción de 15 minutos de hojas de Limón.

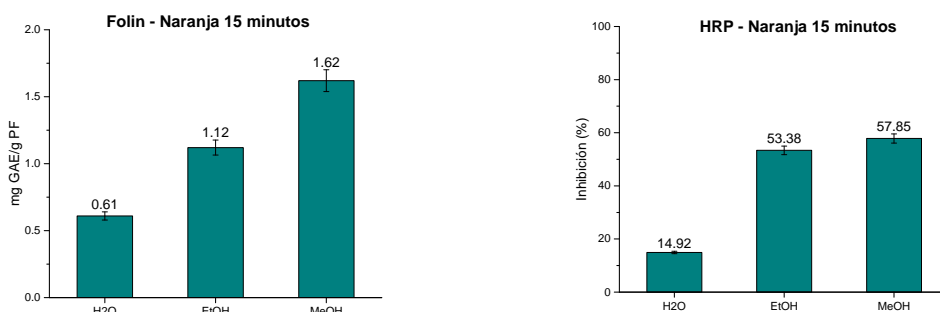


Figura 8.17: Extracción de 15 minutos de hojas de Naranja.

De los resultados anteriores se puede observar que la inhibición enzimática para ambos tiempos es acorde a la técnica de referencia, mostrando la inhibición de la enzima por los extractos obtenidos con etanol, resultados similares a los de metanol. Por lo tanto se puede inferir que 10 minutos de extracción ultrasónica son suficientes para obtener los resultados requeridos.

## 8.5. Discusión

Los estudios realizados evidencian la interacción de los extractos en general y de los flavonoides en especial, con la enzima. La actividad de la enzima se

evalúa bioquímicamente con el método de o-D, el cual se fundamenta en la peroxidación de la o-Dianisidina mediante la HRP utilizando  $H_2O_2$ . Este método tiene una sensibilidad muy alta. La disminución de la actividad enzimática en presencia de flavonoides puros (Naringenina, Hesperidina y Quercetina) permitió comprobar que sería posible utilizar la HRP como biorreceptor. Se conoce que los flavonoides actúan como antioxidantes de sacrificio frente a radicales libres como el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el superóxido ( $O_2^-$ ), etc. Montaña et al. estudió la mecánica de 3 flavonoides, Quercetin, Rutina y Morina, y encontró que los dos últimos tendrían una mecánica antioxidante similar a la Hesperidina y la Naringenina respectivamente si comparamos sus estructuras globales y polaridades. Por otro lado, la mecánica de consumo de las especies oxidantes por parte de los flavonoides, no afecta al  $H_2O_2$  [292]. Sin embargo, como el objetivo es conocer el comportamiento de la enzima en extractos vegetales, se hicieron pruebas incubando tanto a los flavonoides puros como con los extractos con el peróxido, previo a la medición de absorbancia. En ambos casos se pudo comprobar que no hubo degradación apreciable del peróxido. Mediante los ensayos de Folin-Ciocalteu en los extractos se comprueban los distintos niveles de fenoles totales. Se realizaron ensayos en HPLC con lo que se observó lo anterior de manera más detallada. Se hizo pasar por la columna Hesperidin y Quercetin para determinar los tiempos de retención de cada uno y así poder inferir su presencia en los extractos. Con esa información se pudieron estimar las concentraciones de los flavonoides puros y hacer el aumento porcentual relativo de cada uno imitando las condiciones de enfermedad. Con este aumento relativo se pudo comprobar la hipótesis del método. En el caso de los extractos de tallo se pudo también observar inhibición enzimática, siendo la naranja la que produjo una inhibición un poco mayor.

## 8.6. Conclusiones

En esta sección se evaluó la posibilidad de utilizar a la enzima HRP como biodetector en un biosensor para la determinación de polifenoles en diferentes extractos. De los resultados obtenidos, se observa que es posible emplear la enzima HRP en un biosensor donde el principio de transducción sea la inhibición de la misma por los flavonoides presentes en los extractos. Se empleó el método bioquímico de la o-D, que es un sistema muy sensible, con el cual se logró distinguir diferencias en la concentración de polifenoles en cantidades muy pequeñas de extractos de distintas variedades de citrus tanto en hojas co-

mo en tallos. También se pudo determinar que cada flavonoide puro posee un grado de inhibición diferente. El método desarrollado en este trabajo mostró ser más sensible a la presencia de polifenoles que la técnica Folin. Esto se infirió de la necesidad del Folin de concentrar la muestra previo a la determinación. En el caso de nuestro biosensor, se obtuvieron resultados acordes al Folin a partir de muestras crudas, es decir, sin concentrarlas previamente. Por último, en base a resultados preliminares, se pudo demostrar la habilidad del biosensor para detectar diferencias entre plantas sanas e infectadas con HLB.

## Capítulo 9

# Inmovilización de la enzima para el biosensor de HLB

*Dado que existe una ley como la de la gravedad el universo pudo crearse a sí mismo de la nada, como así ocurrió. La creación espontánea es la razón de que exista algo, en vez de nada, de que el universo exista, de que nosotros existamos. No es necesario invocar a Dios para que encienda la mecha y ponga el universo en funcionamiento.*

Stephen Hawking

## 9.1. Introducción

Los resultados presentados en este capítulo forman parte de la tesis de grado del Ing. Fernando Ashur, la misma fue planificada y dirigida por el autor de esta tesis. El trabajo consistió en la optimización de un sustrato adecuado para la implementación del biosensor de HLB, que como se presentó en el capítulo 8, se trata de un biosensor de inhibición de la enzima HRP.

El principio de funcionamiento de los biosensores enzimáticos de inhibición, se basa en la cuantificación de un inhibidor, midiendo la actividad enzimática tanto en ausencia como en presencia del inhibidor. El estudio de la inhibición es a menudo, crítico en el campo clínico, porque algunas drogas se basan en la inhibición de enzimas clave para vías biológicas, mientras que otros inhibidores son considerados compuestos tóxicos; así, los biosensores basados en inhibición enzimática son herramientas confiables para la detección de muchos compuestos tóxicos. Dada la necesidad de biosensores por inhibición altamente sensibles, es fundamental la optimización de parámetros clave como concentración de enzima, concentración de sustrato y tiempo de incubación, como así también el diagnóstico del tipo de inhibición. Los tipos de inhibición pueden ser clasificados como irreversibles o reversibles. La inhibición irreversible se caracteriza por una unión covalente entre el inhibidor y el sitio activo de la enzima. Consecuentemente, la enzima queda permanentemente inactivada. En el caso de la inhibición reversible, por el contrario, la enzima inhibida puede recuperar su actividad original mediante un simple lavado con agua o buffer. Para cuantificar la inhibición, se usa el término “grado de inhibición” que se define como la relación entre la diferencia de la actividad enzimática en ausencia y en presencia del inhibidor; y la actividad enzimática en ausencia del inhibidor. Se define, además, el parámetro  $I_{c50}$  como la concentración de inhibidor que produce un 50 % de inhibición y  $K_i$  como la constante de inhibición que mide la afinidad de la enzima al inhibidor. Amine et al. propuso un método gráfico para el análisis de los resultados y la determinación de la  $I_{c50}$  y  $K_i$  de un biosensor de inhibición [293]. En ese trabajo, demostró que la ecuación del grado de inhibición ( $y$ ) puede expresarse de la siguiente manera:

$$y = \frac{[I]}{[I] + [I_{50}]} \quad (9.1)$$

Reacomodando:

$$y = \frac{\frac{[I]}{[I_{50}]}}{\frac{[I]}{[I_{50}]} + 1} \quad (9.2)$$

Trazando el grado de inhibición ( $y$ ) vs.  $I/I_{50}$ , y dando a  $I$  valores entre  $0,1 \times I_{50}$  y  $10 \times I_{50}$ , se obtiene una hipérbola, similar a la curva tradicional de Michaelis-Menten [293]. Los valores de inhibición de alrededor del 50 % (considerando el valor del 50 % dentro del rango del 20 al 70 %) se pueden usar para una estimación rápida de la  $I_{50}$ . Este enfoque permite realizar un único experimento de inhibición para la estimación de  $I_{50}$  sin ningún conocimiento previo de la concentración del sustrato,  $K_i$  o incluso el tipo de inhibición, ofreciendo un cálculo rápido de  $I_{50}$  [293].

#### *Rango Lineal de trabajo*

La curva general del grado de inhibición en el caso de la inhibición reversible indica que el límite superior del rango lineal está en el rango de concentración del inhibidor y es igual a la  $I_{50}$ . Se debe tener en cuenta que cuando  $[I]=0,1I_{50}$ ,  $y=0,091$ , y cuando  $[I]=10I_{50}$ , entonces  $y=0,91$ . Por lo tanto, el rango dinámico de concentración de inhibidor se puede considerar de dos décadas. En el caso de la enzima inmovilizada en el transductor, puede existir una barrera difusional que limite el acceso del sustrato o inhibidor a la enzima. En consecuencia, se observará una disminución de la sensibilidad y una linealidad extendida. Se pueden detectar bajas concentraciones de inhibidor si  $K_i$  es muy bajo.

En el caso de los inhibidores irreversibles, la sensibilidad aumenta al aumentar el tiempo de incubación hasta alcanzar una meseta. Además, el uso de muchas unidades enzimáticas disminuye la sensibilidad, por lo tanto, en lugar de la inclusión de gel, se prefiere una inmovilización por adsorción y por enlace covalente, debido a la baja cantidad de enzima por gramo o por  $\text{cm}^2$  proporcionado por estos métodos.

Otro aspecto importante a investigar es la concentración del sustrato. En el caso de la inhibición irreversible, la concentración de sustrato debe seleccionarse juiciosamente para lograr una alta tasa de actividad enzimática, preferiblemente en el punto de inicio de la meseta de la curva de Michaelis-Menten. Además, se debe resaltar que es importante evitar concentraciones muy altas de sustrato, para evitar el consumo de reactivo y la inhibición debido a la alta concentración de sustrato.

El valor del blanco ( $V_0$ ) no es cercano a cero, ya que  $V_0$  corresponde al 100 % de la respuesta de la señal (en ausencia de inhibidor). Por lo tanto, la SD puede

ser alta, y pequeñas variaciones de  $V_0-V_i$  son difíciles de cuantificar con precisión. Se ha informado en la literatura que el límite de detección (LOD) se puede fijar a 5 %, 10 % y 20 % del grado de inhibición. Fue sugerido por Amine et al. [294] usar 10 %.

#### *Selectividad*

Se reportó que, en el caso de inhibición irreversible, las interferencias pueden evitarse si se emplea el "método de intercambio de medio"[295]. Este método permite evitar interferencias electroquímicas y enzimáticas. Las interferencias electroquímicas se eliminan porque la actividad enzimática residual se mide en una nueva solución de sustrato, en ausencia de la muestra real. Las interferencias enzimáticas se evitan porque, después de la etapa de incubación, el biosensor se lava con agua destilada, y de esta manera solo se mide la actividad enzimática disminuida debido al inhibidor unido a la enzima.

Aunque el biosensor basado en la inhibición de la enzima no es específico, puede considerarse como un excelente dispositivo rápido y económico para los métodos de detección.

## **9.2. Materiales y métodos**

### **9.2.1. Reactivos y equipamiento**

Las enzimas utilizadas en este trabajo, peroxidasa de rábano (HRP) y se obtuvo de Sigma Aldrich, liofilizada, por lo que, para su uso, fue resuspendida en buffer PBS 0,01 [M] (pH 7,2) preparado en el laboratorio, y conservada en heladera a 4°C. La o-Dianisidina, el glutaraldehído y el quitosán también se obtuvieron de Sigma Aldrich. El metanol se obtuvo de Sintorgan. La polietilenimina (PEI), las nanopartículas de  $TiO_2$  y la microcentrífuga fueron gentilmente cedidos por el profesor Daniel Valdeón, de la cátedra de Microbiología de la FACET - UNT. En todos los casos en los que se realizó lijado, salvo que se especifique lo contrario, se usaron lijas al agua de tamaño de grano 120, marca Norton, compradas en ferretería. El espectrofotómetro usado en todos los ensayos, es un equipo Hitachi U-1900, también gentilmente cedido por la Dra. Tereschuk, de la cátedra de Química Orgánica de la FACET - UNT.



## 9.2.2. Inmovilización con quitosán

En base a las bondades del quitosán como polímero soporte, mencionadas en el marco teórico, se decidió evaluar su utilidad en la inmovilización de la HRP. Se usaron en general dos concentraciones bajas, dado que, según Wang, mayores concentraciones afectarían la actividad de la enzima. Se probaron diferentes métodos de unión entre las enzimas, el soporte polimérico y nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ , para la inmovilización en PET, usando en algunos de los métodos, glutaraldehído por su conocida función como agente de cross-linking por unión covalente.

### 9.2.2.1. Preparación de la solución de quitosán con nanopartículas

Se prepararon soluciones de quitosán al 0,5 % y 1 % mediante la disolución de 25 mg y 50 mg del polímero, respectivamente, en 5 ml de ácido acético al 1 % v/v. Las diluciones se agitaron a 60 °C durante 5 minutos, en agitador termomagnético. Pasado este tiempo, se pasaron a un agitador magnético común y se mantuvieron agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. Además, usando el mismo procedimiento, se prepararon soluciones de quitosán 0,5 % y 1 % con nanopartículas mediante el agregado de 2 mg de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y 5  $[\mu\text{l}]$  de nanopartículas de  $\text{ZnO}$  en suspensión, cuando se pasan las soluciones a agitador común.

### 9.2.2.2. Inmovilización de HRP en soluciones de quitosán con nanopartículas de $\text{TiO}_2$

Se mezclaron 100  $[\mu\text{l}]$  de las soluciones de quitosán con nanopartículas obtenidas anteriormente, con HRP 7,11 [U/ml] en relación 1:1, y se dejaron reposar durante 8 horas a 4°C. Se verificó que las enzimas seguían activas mediante pruebas colorimétricas y se procedió a mezclar las suspensiones de ambas nanopartículas en quitosán 0,5 % y 1 %, con glutaraldehído en concentraciones de 0,5 % y 1 %. Se dejaron reposar por 8 horas a 4°C.

### 9.2.2.3. Inmovilización de HRP con quitosán, en PET modificado mecánicamente

Se colocaron 10  $[\mu\text{l}]$  de quitosán 0,5 % sobre tiras de PET, de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$ , pretratadas con lijas al agua y se dejaron secar a temperatura ambiente bajo campana de extracción. Luego se colocaron 5  $[\mu\text{l}]$  de HRP 7,11 [U/ml] en

una y 5 [ $\mu$ l] de GOx en otra; y se dejaron secar a 4°C durante 8 horas. Seguidamente, se colocaron 10 [ $\mu$ l] de chitosan 0,5 % y se dejaron secar a temperatura ambiente para, finalmente, agregar 5 [ $\mu$ l] de glutaraldehído 0,025 % y dejar secar nuevamente. Todas las tiras fueron enjuagadas en buffer antes de ser usadas.

#### **9.2.2.4. Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #1 sobre PET modificado mecánicamente**

Sobre la superficie de tiras de PET, de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, pretratadas con lijas al agua, se depositaron 5 [ $\mu$ l] de las soluciones de chitosan - nanopartículas - HRP (antes de agregar el glutaraldehído), y se dejaron secar a 4°C durante 8hs.

#### **9.2.2.5. Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #2 sobre PET modificado mecánicamente**

Sobre tiras de PET, de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, pretratadas con lijas al agua, se colocaron 10 [ $\mu$ l] de chitosan 0,5 % y 1 % con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, obteniendo dos tiras por cada concentración de chitosan. Las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente, luego de lo cual se enjuagaron en buffer PBS. Se dejaron secar nuevamente antes de depositar sobre sus superficies, 5 [ $\mu$ l] de HRP 7,11 [U/ml] y 5 [ $\mu$ l] de GOx 2,4 [mM] en un par de tiras con diferentes concentraciones de chitosan por cada enzima. Finalmente, se dejaron secar por 8hs. a 4°C. Todas las tiras fueron enjuagadas en buffer antes de ser usadas.

#### **9.2.2.6. Inmovilización de HRP en solución de chitosan con nanopartículas #3 sobre PET modificado mecánicamente**

Cuando se exponen a luz UV, se generan en las superficies poliméricas sitios reactivos y es posible modificar el grosor de la capa reactiva, variando la longitud de onda usada o el tiempo de exposición. Se funcionalizó la superficie de tiras de PET mediante irradiación con luz ultravioleta de dos longitudes de onda diferentes: alta (365 [nm]) y baja (254 [nm]). La irradiación se realizó durante 10 minutos para cada longitud de onda. Se inmovilizaron sobre las tiras, soluciones de:

Chitosan 1 % con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y agregando HRP 7,11 [U/ml]; PEI 1 %, con agregado de HRP 7,11 [U/ml]; y PEI - TiO<sub>2</sub>, con agregado de HRP 7,11 [U/ml].

### 9.2.3. Determinación de la cantidad de enzima activa inmovilizada

#### 9.2.3.1. Determinación de la relación enzima - velocidad máxima de reacción

Se realizaron pruebas de actividad en espectrofotómetro para 3 concentraciones diferentes de enzima, agregando concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno para cada una de ellas, hasta alcanzar la velocidad máxima de reacción, donde la velocidad de reacción depende de la cantidad de enzima y no de la cantidad de sustrato disponible. Para los ensayos se usaron 2, 4 y 6 [ $\mu$ l] de HRP 7,11 [U/ml], que corresponden a cantidades de enzima de  $1,42 \times 10^{-2}$  [U];  $2,84 \times 10^{-2}$  [U] y  $4,26 \times 10^{-2}$  [U]. Estos valores se eligieron alrededor de la cantidad usada para la inmovilización (5 [ $\mu$ l] de HRP 7,11 [U/ml] correspondientes a  $3,55 \times 10^{-2}$  [U/ml]). Las concentraciones de peróxido usadas para cada una, se encuentran detalladas en la tabla a continuación.

Cuadro 9.1: Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por celda

Num. de Muestra	2 $\mu$ l 7,11 U/ml ( $1,42 \times 10^{-2}$ U/ml)	4 $\mu$ l 7,11 U/ml ( $2,84 \times 10^{-2}$ U/ml)	6 $\mu$ l 7,11 U/ml ( $4,26 \times 10^{-2}$ U/ml)
Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	mM	mM	mM
1	0,09	0,04	0,4
2	0,49	0,97	2,9
3	0,97	2,43	5,8
4	1,45	5,82	8,7
5	2,43	11,6	11,6
6	-	14,6	14,6

Los datos obtenidos fueron volcados al programa GraphPad, en donde se evaluó el ajuste de los mismos al modelo Michaelis-Menten, y del cual se obtuvieron la constante de Michaelis-Menten ( $k_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), para cada concentración de enzima.

#### 9.2.3.2. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada

Se realizaron ensayos de actividad en espectrofotómetro a tiras de PET con enzima inmovilizada, usando concentraciones de quitosan tanto de 0,5% como de 1%. Para las pruebas se usó peróxido de hidrógeno en cantidad suficiente ( $5,82 \times 10^{-3}$  [M]) para asegurar que se trabajara en zona de velocidad máxima.

Las mediciones se repitieron 5 veces para cada tipo de tira (chitosan 0,5 % y 1 %). Con los datos obtenidos y a partir de la ecuación del ajuste de regresión lineal de la curva, se estimó la cantidad de enzima activa inmovilizada.

#### 9.2.4. Prueba de inhibición con quercetin

Para verificar que el método de inmovilización desarrollado permite una buena difusión de los reactivos hacia los sitios activos de la enzima, y que ésta queda, por lo tanto, susceptible a la inhibición por flavonoides, se realizaron ensayos de actividad en espectrofotómetro a tiras de PET con enzima inmovilizada usando una concentración de chitosan de 1 %; y agregando quercetina, uno de los flavonoides más estudiados y presentes en una gran variedad de especies cítricas, a las muestras en concentraciones crecientes desde 0 [M] (control):  $50 \times 10^{-9}$  [M],  $150 \times 10^{-9}$  [M], y  $500 \times 10^{-9}$  [M].

#### 9.2.5. Determinación de la $I_{c50}$

La  $I_{c50}$ , como se mencionó anteriormente, corresponde a la concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición. Desprende de esta definición que debe definirse para cada inhibidor. En este caso, se evaluaron para quercetina y hesperidina. Del primero ya se mencionaron los motivos para su elección, siendo estos extensivos a la hesperidina, principal flavonoide de las naranjas. Se realizaron ensayos de actividad en espectrofotómetro, con tiras de PET con una concentración de chitosan de 0,5 %. Las pruebas se realizaron agregando concentraciones crecientes, detalladas en las tablas a continuación, tanto de quercetina como de hesperidina, disueltos en metanol 80 %. Este último se usó también como control.

Una vez agregados los inhibidores, las muestras fueron incubadas con los mismos durante 10 minutos antes de dar comienzo a la reacción y seguidamente, a la medición. Los datos de las mediciones se volcaron en una tabla, a partir de la cual se calculó el porcentaje de inhibición correspondiente a cada concentración del inhibidor. En base a esto, a su vez, se estimó el valor del parámetro  $I_{c50}$  (concentración de inhibidor que produce una inhibición del 50 %) para caracterizar los biosensores fabricados.

Cuadro 9.2: Concentración de Quercetin por celda

Vol. inicial	Conc. inicial	Vol. final	Conc. final
$\mu\text{l}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{M}$
10	221	2000	1,1
20	221	2000	2,2
60	221	2000	6,6

Cuadro 9.3: Concentración de Quercetin por celda

Vol. inicial	Conc. inicial	Vol. final	Conc. final
$\mu\text{l}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{M}$
90	1638	2000	73,7
120	1638	2000	98,3
150	1638	2000	122,8
170	1638	2000	139,2
180	1638	2000	147,4
230	1638	2000	188,4

### 9.2.6. Ensayo con muestras reales

Se realizaron pruebas de actividad colorimétricas a tiras de PET, con una concentración de quitosán de 0,5 %. Para estas pruebas, se agregaron diferentes volúmenes de extractos metanólicos de diferentes árboles de citrus, provistos por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). Las muestras, una vez agregados los extractos, se incubaron con los mismos durante 10 minutos antes de dar inicio a la reacción (con el agregado del peróxido), y a la medición. Los extractos usados, denominados E8, E18, E19 y E25, se describen brevemente a continuación.

Cuadro 9.4: Nombres otorgados a las muestras de extractos reales

Extracto	Detalle
E8	Limón Limoneira 8A, de campo en invierno.
E18	Naranja Pinneapple, de invernadero en primavera.
E19	Naranja Pinneapple con Cancrosis.
E25	Limón Lisboa, de invernadero en verano.

## 9.3. Resultados

Para evaluar la efectividad de los diferentes métodos de inmovilización evaluados, se realizaron pruebas de actividad colorimétricas (o-D) a los distintos biosensores fabricados. La determinación del método de inmovilización a emplear se hizo en una primera etapa de manera cualitativa. Una vez elegido el método, se lo evaluó cuantitativamente.

En el marco de esta tesis, se describen todos los resultados del trabajo de finalización de carrera del Ing. Ashur. Con el fin de amenizar la lectura de este trabajo, solo se muestran las imágenes de lo que se determinó como el mejor método de inmovilización.

### 9.3.1. Inmovilización con quitosán

#### 9.3.1.1. Inmovilización de HRP en PET modificado mecánicamente, con solución de Quitosán y nanopartículas de $\text{TiO}_2$

Este método, además de ser el más sencillo y posiblemente, el más económico por la menor cantidad de insumos que requiere, resultó ser el más efectivo, dando las pruebas de actividad una buena coloración y en poco tiempo, para las dos concentraciones de quitosán usadas. Esta determinación se hizo cualitativamente observando el color luego de las pruebas con la o-D.

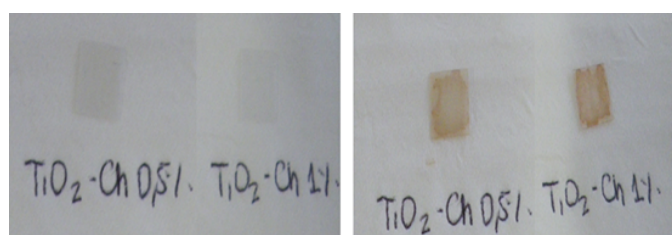


Figura 9.1: Tiras de PET lijadas, preparadas según el método 2.4.5 (chitosán 0,5% y 1% con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ ); antes (izq.) y después (der.) de las pruebas de color.

### 9.3.2. Determinación de la cantidad de enzima activa inmovilizada

Los datos de las mediciones para cada concentración de enzima se exportaron al software GraphPad Prism. El mismo permitió realizar un ajuste no lineal de los datos al modelo de cinética Michaelis – Menten y proporcionó, a su vez, los mejores ajustes de  $V_{\text{máx}}$  para cada set de datos.

A partir de los valores de velocidades máximas determinados para cada concentración de enzima, se realizó un modelo de regresión lineal del cual, a su vez, se obtuvo la ecuación que lo describe y que determina la relación cantidad de enzima – Velocidad máxima de reacción.

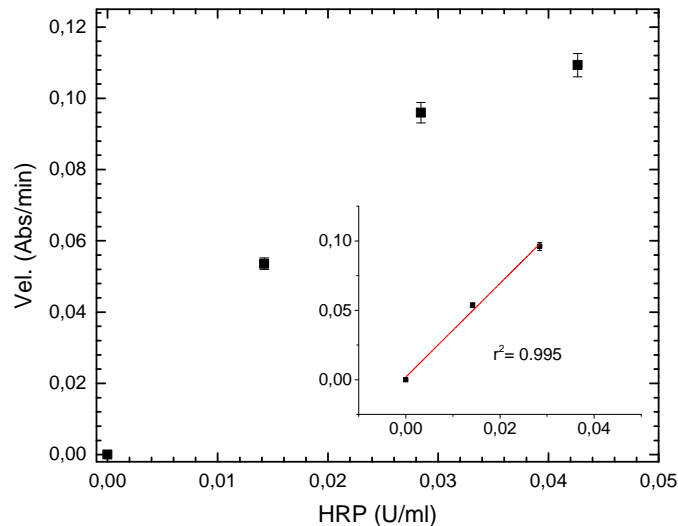


Figura 9.2: Velocidad máxima de reacción vs. concentración de HRP. El inset muestra la recta de calibración para los tres primeros puntos.

A partir de los valores de velocidades máximas determinados para cada concentración de enzima, se realizó un ajuste lineal (recuadro de la figura 9.2) del cual se obtiene la ecuación que relaciona a la cantidad de enzima con la velocidad máxima de reacción. La ecuación obtenida experimentalmente es la siguiente:

$$V_{max} = 2,43[E] + 0,01 \quad (9.3)$$

Como con las tiras de PET se trabajó de manera tal que las reacciones se dieran directamente en la zona de velocidad máxima, los resultados de las mediciones corresponden a dichos valores. Así, se tomaron los promedios de 4 ensayos de las velocidades máximas medidas para cada tipo de tira (chitosan 0,5 % y 1 %) y con dichos valores, reemplazando en el miembro izquierdo de la ecuación anterior y despejando, se obtuvo un estimado de la cantidad de enzima activa inmovilizada en cada tira.

Cantidad de enzima activa en tiras con chitosan 0,5 %:  
 $3,09 \times 10^{-02} \pm 0,02 \times 10^{-02}$  [U/ml]

Cantidad de enzima activa en tiras con chitosan 1 %:  
 $2,51 \times 10^{-02} \pm 0,08 \times 10^{-02}$  [U/ml]

Estos resultados son consistentes con lo observado en las pruebas de color y eran de esperarse si se observa que los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  para las tiras del primer grupo, además de ser más homogéneos que los del segundo, son, en general, más altos. Comparando estos valores con la concentración de enzima usada en la inmovilización ( $3,55 \times 10^{-2}$  [U/ml]) puede notarse que la inmovilización es efectiva, manteniendo activa un alto porcentaje de la enzima usada en un principio.

### 9.3.3. Prueba de inhibición con quercetin

Se usaron las tiras con chitosan 1 % dado que, de los dos métodos usados, fueron las que menos cantidad de enzima activa retuvieron al final del proceso, y evaluar su comportamiento frente a la presencia del inhibidor, correspondía a evaluar el caso menos favorable.

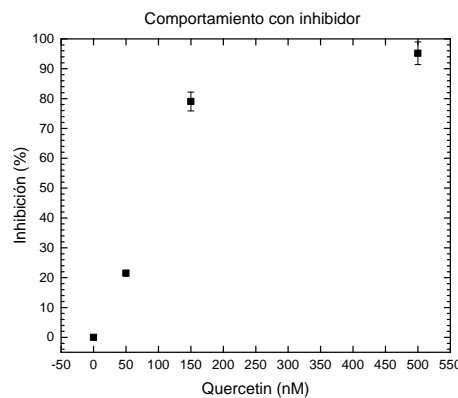


Figura 9.3: Grado de inhibición enzimática en función de la concentración del Quercetin

Los resultados fueron satisfactorios, mostrando los biosensores una buena respuesta frente al inhibidor, es decir, mostraron actividad decreciente conforme la concentración de quercetina aumentaba, a partir de un valor umbral que, en este caso, se determinó que estaba cerca de los 50 [nM].

### 9.3.4. Determinación de la $I_{c50}$

El quercetin posee un mayor poder inhibitorio sobre la actividad de la peroxidasa de rábano inmovilizada en PET que la hesperidina, lo cual se ve plasmado en la concentración de cada inhibidor que produce la inhibición del 50 % ( $I_{c50}$ ). En el caso de la hesperidina, este parámetro se ubicó entre valores de 122,84 [ $\mu$ M] y 147,41 [ $\mu$ M]. Para el quercetin, en cambio, se ubicó entre valores de 1,12 [ $\mu$ M] y 3,36 [ $\mu$ M].



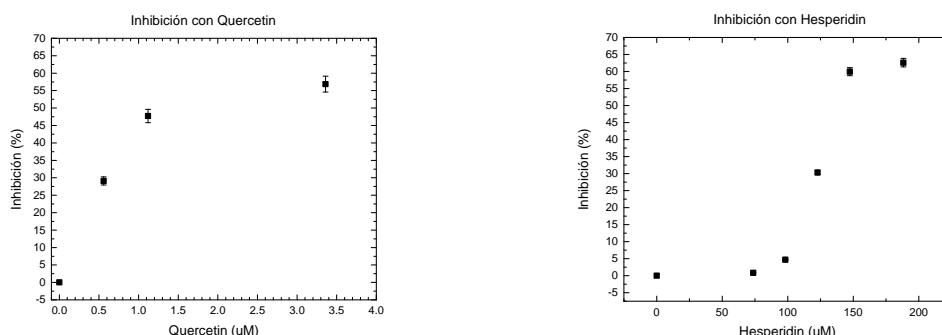


Figura 9.4: Curvas de inhibición para la determinación de la  $I_{c50}$  para el Quercetin (derecha) y Hesperidin (izquierda).

Por medio de interpolación lineal simple, se aproximaron los valores de  $I_{c50}$  para cada inhibidor, siendo éstos de 1,68 [ $\mu\text{M}$ ] y 139,16 [ $\mu\text{M}$ ] para quercetin y hesperidin respectivamente.

### 9.3.5. Ensayo con muestras reales

De los extractos ensayados, solo dos (E18 y E25) mostraron un comportamiento similar al del ensayo de control, con una apreciable disminución en la actividad de la enzima inmovilizada.

Debe tenerse en cuenta que, al trabajar con extractos reales, se tienen en realidad combinaciones de flavonoides. No obstante, es apreciable que todas las curvas de actividad enzimática obtenidas en los ensayos son lo suficientemente disímiles como para ser diferenciadas unas de otras.

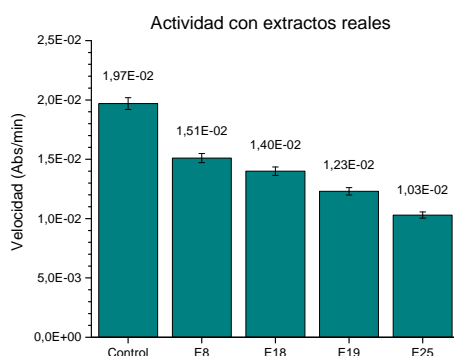


Figura 9.5: Actividad enzimática en presencia de distintos extractos reales de hojas de cítricos.

Los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar de tres ensayos se pueden observar en el siguiente cuadro.

Cuadro 9.5: Actividad enzimática con extractos reales

Extracto	Actividad (Abs/min)
Control	0,0197 ± 0,0005
E8	0,0151 ± 0,0004
E18	0,0140 ± 0,0004
E19	0,0123 ± 0,0003
E25	0,0103 ± 0,0003

## 9.4. Conclusiones

Se estudiaron diferentes formas de modificar la superficie del soporte del biosensor (PET) para lograr la adherencia del elemento de biorreconocimiento al mismo, donde el lijado y la irradiación con luz UV demostraron ser los mejores. Partiendo de esos resultados, se trabajó con el PET lijado para caracterizar el comportamiento del biosensor. Por un lado, ese método mostró una calidad de inmovilización similar a la irradiación y por el otro, más mucho más económico con menor consumo de energía.

En cuanto al polímero y nanoestructuras, el quitosán y las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> resultaron en la mejor combinación para inmovilizar la HRP. Haciendo uso de una misma concentración de nanopartículas, el quitosán al 0,5 % mostró la mayor cantidad de enzima activa comparado al polímero concentrado al 1 %.

Mediante este método, además, se obtuvo un biosensor económico, capaz de indicar semi-cuantitativamente, la mayor o menor presencia de inhibidores fenólicos en una muestra de laboratorio de extractos de hojas de cítricos. El biosensor desarrollado mostró un buen comportamiento tanto frente a inhibidores de referencia, como frente a muestras de campo, de diferentes ejemplares de citrus.

# Capítulo 10

## Conclusiones generales y perspectivas futuras

*Solo somos una raza de monos avanzados en un planeta más pequeño que una estrella promedio. Pero podemos entender el universo. Eso nos hace muy especiales.*

Stephen Hawking

## Conclusiones generales

En la presente tesis doctoral se estudiaron diferentes materiales nanoestructurados y distintas formas de funcionalización e inmovilización de bioreceptores, como enzimas o anticuerpos, para su aplicación en el desarrollo de biosensores. Las nanoestructuras estudiadas fueron NPs y ThFs de ZnO, NPs de TiO<sub>2</sub> y NPs y ThFs de PB. El principio de transducción aplicado para el estudio fue el método cronoimpedancimétrico desarrollado en nuestro Laboratorio de Medios e Interfases (LAMEIN).

En primer lugar, se estudiaron dos biosensores de glucosa en dos variantes, una con la enzima glucosa oxidasa (GOx) depositada sobre la superficie, y la otra, y con la misma enzima previamente inmovilizada sobre nanopartículas de ZnO. En ambos casos se obtuvo una respuesta lineal por debajo de los 4 mM (rango de utilidad para las concentraciones de glucosa en sangre normales), lo que demuestra una buena sensibilidad a bajas concentraciones. Sin embargo, la sensibilidad obtenida por el biosensor con ZnO NPs es de un orden de magnitud mayor. La fase de la impedancia compleja demostró ser el aspecto con mejor sensibilidad. Con el biosensor con nanopartículas fue posible detectar concentraciones de glucosa menores a 1 mM. Los estudios de vida útil de estos biosensores mostraron una disminución de la sensibilidad, pero manteniéndose su respuesta en el mismo orden de magnitud. Esta pérdida de sensibilidad podría atribuirse a los fenómenos superficiales que pueden sufrir las NPs, ya que su superficie es muy reactiva y sensible a impurezas. Los resultados presentados son preliminares, pero muestran ser promisorios para el desarrollo de biosensores ultra sensibles.

Debido al éxito de la respuesta del ZnO nanoestructurado para aplicaciones de biosensado, se estudiaron thin films de ZnO y su comportamiento frente a distintas soluciones. Los resultados de nuestro trabajo previo [219] muestran que la conducción de los límites de grano se ve fuertemente afectada por los diferentes agregados y su contribución domina el valor de la impedancia después del secado del agregado. Se usaron circuitos RC equivalentes utilizado para ajustar los datos. Por otro lado, se vió que la temperatura de crecimiento de los TFs influye mucho en la respuesta a las soluciones que se agregan sobre su superficie. El mayor aumento de la impedancia, de 2 órdenes de magnitud, se obtiene después de la adición de una gota de Glucosa en concentración de 3 mM sólo para TFs crecidos a 600°C y con enzima en su superficie. Para el desarrollo de sensores de glucosa no invasivos, el analito debe medirse en lágrimas,

saliva o sudor en lugar de sangre. Dado que la concentración de glucosa es mucho menor en estos fluidos, el desafío es diseñar sensores con una sensibilidad muy alta y con la capacidad de detectarla en pequeños volúmenes.

Otro resultado de esta tesis, fue el uso de ingeniería de superficie, para demostrar la modificación estable de los electrodos para la fabricación de biosensores de afinidad. Para esto, se Inmovilizaron nanopartículas de ZnO enlazadas covalentemente a un electrodo de oro por medio de una monocapa autoensamblada con un grupo funcional, el ácido fosfónico. Dicha inmovilización fue producto de un método simple y probó gran estabilidad, inclusive luego de 6 horas en un baño ultrasónico donde el electrodo estuvo inmerso en etanol absoluto. Estas nanopartículas fueron las que permitieron posteriormente la inmovilización de un anticuerpo. Por último, el sistema presentó resultados preliminares satisfactorios para la detección de un antígeno.

Buscando mejorar aún más la detección de  $H_2O_2$  y en última instancia de glucosa, entre otros analitos, se estudió el uso de las PBNPs tanto solas como combinadas con otras nanoestructuras. Se obtuvo un sensor multinanoestructurado con un LOD de  $0,0084 \mu M$  ( $3\sigma$ ), un LOQ de  $0,0686 \mu M$  ( $10\sigma$ ) y una sensibilidad de  $55.24 \times 10^3 \mu A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$ . El sensor desarrollado posee un LOD menor comparado con otros trabajos en la bibliografía. Algo importante para remarcar es su fabricación sencilla y su funcionamiento a 0 V. Por otro lado, tanto las mediciones de impedancia como el comportamiento dinámico, demostraron el beneficio de emplear la combinación de dos nanoestructuras. Por último, otra característica destacable del sensor es la fuerte adhesión de las PBNPs al transductor sin necesidad de pasos químicos para formar enlaces covalentes, además de no disolverse en soluciones de pH neutro o ligeramente básicos. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas presentadas por las PBNPs, el método de deposición sobre el transductor no permite realizar la deposición sobre un área determinada. Por ello, se estudiaron otros métodos de funcionalización superficial con Prussian Blue para lograr la desposición sobre un área específica y a elección. Para esto, se utilizaron dos métodos de electrodeposición para modificar la superficie del dispositivo MDEA. Como resultado de esto, se obtuvieron dos tipos de films de PB nanoestructurados. El método potencioestático generó un film de Hierro níquel hexacianoferrato y el potenciodinámico generó un film de níquel hexacianoferrato. El primer método mostró una sensibilidad 200 veces mayor que el segundo. Aún más, el método potencioestático fue capaz de obtener valores de  $i_{ss}$  tales que pudieron seguir los cálculos teóricos dentro del rango alto de  $H_2O_2$ . Se puede inferir de estos resultados, que la presencia del

hierro en estado ferroso mejoró la respuesta del sensor al  $H_2O_2$ .

Uno de los resultados más importantes de esta tesis, es el desarrollo de un posible biosensor para la detección del HLB. La inhibición dosis-dependiente de los compuestos fenólicos sobre la enzima peroxidasa permitiría identificar plantas de citrus con HLB desde el inicio de los síntomas. Se empleó el método bioquímico de la o-D, que es un sistema muy sensible, con el cual se logró distinguir diferencias en la concentración de polifenoles en cantidades muy pequeñas de extractos de distintas variedades de citrus tanto en hojas como en tallos. También se pudo determinar que cada flavonoide puro posee un grado de inhibición diferente. El método desarrollado en este trabajo, en base a las muestras medidas, una sensibilidad mayor a la presencia de polifenoles totales comparado a la técnica del Folin. Esto se infirió de la necesidad del Folin de concentrar la muestra, previo a la determinación. En el caso de nuestro biosensor, se obtuvieron resultados acordes al Folin a partir de muestras crudas, es decir, sin concentrarlas previamente. Por último, en base a resultados preliminares, se pudo demostrar la habilidad del biosensor para detectar diferencias entre plantas sanas e infectadas con HLB. Una vez estudiado cómo lograr el biorreconocimiento de los analitos necesarios para determinar el estado de salud de plantas de cítricos, se estudiaron diferentes formas de modificar la superficie del soporte del biosensor (PET) para lograr la adherencia del elemento de biorreconocimiento al mismo, donde el lijado y la irradiación con luz UV demostraron ser los mejores. En cuanto al polímero y nanoestructuras, el quitosan y las nanopartículas de  $TiO_2$  resultaron en la mejor combinación para inmovilizar la HRP. Se obtuvo un biosensor económico, capaz de indicar semi-cuantitativamente, la mayor o menor presencia de inhibidores en una muestra de laboratorio de extractos de hojas de cítricos. El biosensor desarrollado mostró un buen comportamiento tanto frente a inhibidores de referencia, como frente a muestras de campo, de diferentes ejemplares de citrus.

## Perspectivas futuras

1. El estudio en profundidad de las interacciones de las PBNPs con los transductores utilizados como así también sobre sus propiedades catalíticas y mecanismos de conducción. Por otro lado, es de interés su posible utilización como sondas de revelado en inmunoensayos y su deposición selectiva sobre distintos electrodos.

2. La aplicación de los sensores y biosensores desarrollados en esta tesis en plantas enfermas con HLB y otras enfermedades, no sólo en cítricos sino también en otras especies como frutilla, olivo y la posibilidad de medir distintos compuestos en vinos.

# Apéndice A

## Obtención de antígeno NPTII

### A.1. Purificación del NPTII

La totalidad del gen de neomycin phosphotransferase II gene (NPTII) fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido pEA1 [296]. Esto se realizó utilizando los plásmidos:

nptIIF (forward: 5'-ACTTGTCGACATGATTGAACAAGATGGATTG -3') y nptIIR (reverse: 5'-TTATAAGCTTTATGTCCTGATAGCGGTC-3'). El fragmento de PCR resultante fue clonado en el vector pGEM-Teasy (Promega, USA). El plásmido resultante fue digerido con Sal I y HindIII y luego ligado al vector pQE31 mediante las mismas enzimas. El plásmido vector fue transformado en una cepa de *E. coli* M15 [pREP4], la cual es capaz de producir proteínas recombinantes. pQE31 contiene genes resistentes a la Ampicillin y la Kanamicin y la expresión del gen nptII está controlado por un promotor de inducción, isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

Se cultivó una sola colonia de *E. coli* M15 [pREP4] con el contenido del NPTII en un medio Luria Bertani. El mismo contenía 0.2  $\mu$ g/ml de Ampicillin y 0.2  $\mu$ g/ml de Kanamicyn y se lo mantuvo a 37 °C hasta alcanzar 0,6 de densidad óptica. La producción de NPTII se indujo agregando IPTG 0.5 mM. Pasadas las 3 horas, las células se recuperaron por centrifugación a 7000x g durante 5 min y 4 °C. El pellet obtenido se enjuagó con 500 mM PBS pH 8 y se volvieron a centrifugar. Las células fueron lizadas agregando 1 mg/ml de Lysozyme en búffer de lisis (300 mM NaCl, 10 mM Imidazole y 50 mM de buffer sodio fosfato, pH 8) incubando a 37 °C por una hora y luego se guardaron a -20 °C overnight. Luego las muestras fueron descongeladas y sonicadas en baño de hielo (10 pulsos de 10 segundos de duración cada uno al 30 % de la amplitud máxima), esto se realizó con un sonicado QSonica Q700 (Qsonica, USA). Por úl-



timo se centrifugaron a 12000x g durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante y la proteína NPTII recombinante fue purificada utilizando un kit de purificación denominado "Ni-NTA spin column kit" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis SDS-PAGE [297] se llevó a cabo en un gel de 12 % de poli-acrilamida usando 20 mA de corriente continua durante 90 min. Para evaluar la pureza de la proteína se utilizó Coomassie Blue R250 y para evaluar su concentración se utilizó el método Bradford [298] haciendo uso de BSA como proteína estándar.

## A.2. Dot-blot

Diluciones de proteína NPTII recombinante pura (antígeno) disuelta en buffer Tween-TBS (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.05 % Tween 20) se agregó en papel de nitrocelulosa con 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro. Las alícuotas fueron de 2  $\mu$ l y concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 ng de proteína. Luego de secarse las alícuotas, las membranas se bloquearon para evitar la unión inespecífica. El bloqueo se realizó incubando la membrana overnight en buffer TBS-Tween suplementado con 5 % de leche descremada a 4 °C en un agitador orbital, y por último las membranas fueron lavadas delicadamente con buffer TBS-Tween. Luego fueron sumergidas en una dilución del anticuerpo primario Anti-Neomycin Phosphotransferase II (1:1000) en buffer TBS-Tween suplementado con 5 % de leche descremada. Las membranas fueron incubadas en dicha dilución durante 2 horas en un agitador orbital a 50 rpm y 4 °C y por último lavadas 3 veces con buffer TBS-Tween. Luego, las membranas se sumergieron en una dilución del anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG marcado con HRP (1:2000) en buffer TBS-Tween suplementado con 5 % de leche descremada. Las membranas se incubaron en la dilución del anticuerpo secundario durante 2 horas en agitación orbital a 50 rpm y 4 °C. Por último, las membranas se lavaron 3 veces con buffer TBS-Tween y se revelaron sumergiéndolas en solución 0.16 mM de o-Dianisidine en 50 mM buffer phosphato (pH 7) y 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### A.2.1. Resultado del Dot-blot

La Proteína NPTII pura se obtuvo por cromatografía de afinidad siguiendo los procedimientos descriptos en la sección de materiales y métodos a partir de una sepa de E.coli transformada. El Dot-Blot mostró la detección específica de NPTII a partir del mínimo de 5 ng, figura A.1. La optimización de las concen-

traciones y los ensayos de Dot-Blot fueron realizados como parte de la tesina de grado de Ingeniería Biomédica de Luis Castro, bajo la dirección del autor de esta tesis.

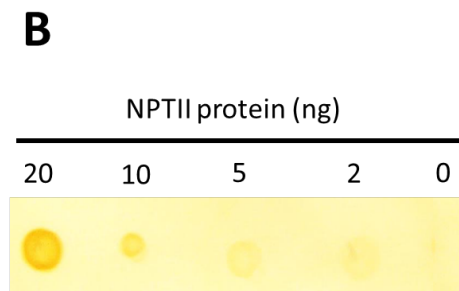


Figura A.1: Ensayo Dot blot de diferentes cantidades de NPTII (0, 2, 5, 10 and 20 ng) sobre membrana de nitrocelulosa. Esto fue detectado mediante la unión de un anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG marcado con HRP al anticuerpo policlonal Anti-NPTII.

## Apéndice B

### Algunas Enfermedades del Citrus

Al tratar las enfermedades de los citrus, se deberán desestimar las imprecisiones al hacer referencia a períodos de susceptibilidad de las plantas o de incubación de algunas enfermedades, por ejemplo, que inevitablemente surgirán al hacer generalizaciones para todos cítricos. Se pueden clasificar las enfermedades de los citrus según aquellas que afectan la planta comprometiendo: su longevidad, su potencial productivo o la calidad de la hoja. Por otro lado, si hubiera que jerarquizar las enfermedades que afectan a los cítricos, se obtendrían diferentes resultados según el criterio usado, por lo que resulta conveniente desarrollar las distintas enfermedades clasificándolas según los factores patogénicos que las causan [299].

#### B.1. Fúngicas

##### B.1.1. *Sarna*

Es más una familia de enfermedades producida por hongos del género *Elinoe*. Se distinguen la sarna del citrus, causada por *E. Fawcetti*; y la sarna del naranjo dulce, causada por *E. Australis*. La primera, afecta hojas y frutos mientras que la segunda afecta, además, las ramas. Según el Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO), la sarna del citrus se encuentra presente y ampliamente distribuida en el país, mientras que la sarna del naranjo dulce, si bien presente, se desconoce su distribución. Cabe destacar que esta última, afecta no solo a naranjas (*C. Sinensis*), sino también a mandarinas (*C. Reticulata*). La sarna de los citrus se manifiesta especialmente en los frutos. Las lesiones aparecen desde que éstos cuajan hasta que alcanzan 3-4 cm cubriendo su superficie de pequeñas excrecencias corchosas aisladas y más o

menos cónicas o agrupadas. Estas excrescencias son al principio de color ocráceo pardusco. Cuando el ataque es grave puede provocar la caída de la fruta joven si los árboles están debilitados. Por lo general esta enfermedad no afecta la productividad, pero en variedades susceptibles, tales como mandarinas satsuma, ve muy afectado el aspecto externo de la fruta y por lo tanto disminuida su calidad comercial [300]



Figura B.1: Lesiones producidas por la Sarna de los citrus en hojas (izquierda) y fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia.

La sarna del naranjo dulce se manifiesta principalmente en las hojas. Las lesiones en hojas jóvenes inician como pequeñas costras acuosas, que al crecer toman una coloración amarilla cremosa o colores brillantes. Estas crecen como excrescencias irregulares, globosas o cónicas que se unen y se extienden a lo largo de las nervaduras principales cubriendo gran parte de las hojas, particularmente el envés. Las lesiones viejas tienen una superficie rugosa, son oscuras y se agrietan. Las hojas afectadas no crecen, presentan malformaciones, son arrugadas con márgenes irregulares. Además, los árboles afectados manifiestan defoliación cuando ocurren infecciones severas. brotes tiernos y tallos de las plantas las cuales suelen permanecer achaparradas. Los pedicelos y botones florales también pueden ser atacados. Los frutos son infectados en las primeras etapas de su desarrollo, crecen deformes y caen de forma prematura. En la cáscara de los frutos en crecimiento se forman lesiones de diferente tamaño y color de acuerdo a la especie, y se presentan como protuberancias dispersas, con proyecciones cónicas o como cráteres en crecimiento y pueden coalescer para dar origen a parches de costras o grandes áreas con erupciones. Sin embargo, las lesiones no penetran hasta alcanzar los carpelos.



Figura B.2: Lesiones producidas por la Sarna del naranjo dulce en hojas (izquierda), y fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia.

### B.1.2. *Melanosis*

Es causada por el *Diaporthe Citri*, un hongo saprófito. Afecta a naranjos, mandarinos, limoneros y pomelos, siendo últimos dos, más susceptibles [301]. Se vuelve importante donde el desarrollo temprano de los frutos coincide con la época de lluvias abundantes. La infección se da en ramitas jóvenes muertas por helada. Luego de un proceso de colonización de aproximadamente 2 meses, se comienzan a producir picnidios por un periodo de cerca de un año, luego del cual comienzan a formarse peritecios. Los picnidios exudan los conidios en cirros, lo que constituye una adaptación a la diseminación por agua, y los peritecios producen ascosporas, que se dispersan a través del aire a largas distancias. En este caso, el tiempo requerido de hoja mojada para la infección es mayor cuanto menor es la temperatura. Aunque las ramitas débiles son las únicas susceptibles a la infección, este patógeno es capaz de producir daños en frutos, hojas y brotes jóvenes. En las hojas aparecen lesiones pequeñas, semejantes a pústulas, de color pardo oscuro hasta negro brillante, predominando en la cara superior y con tendencia a agruparse en forma circular. En los citrus muy atacados de melanosis, las hojas nuevas son de color verde amarillento y tardan más tiempo que las sanas en adquirir el color verde oscuro. Las ramitas terminales también se cubren con pústulas, pero en este caso las rodean totalmente, tomando la corteza un color de azúcar quemado [299]. Los frutos también presentan estas pústulas, que pueden disponerse sin orden o bien dándole al fruto un aspecto de "chorreado". Los frutos, además, presentan una podredumbre que se inicia donde se unen con el pedúnculo, produciéndose un oscurecimiento de la región, de color castaño cuero. Las ramitas jóvenes se secan y los frutos quedan desfigurados o se pudren y caen. Actualmente, esta enfermedad se encuentra presente en nuestro país, aunque se desconoce su distribución [301].



Figura B.3: Síntomas de melanosis en fruta (izquierda), y hoja (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia.

### B.1.3. Mancha Grasienta

Esta enfermedad es producida por la *Mycospharella Citri*. Afecta hojas y frutos de pomelos, mandarinas, naranjas y limones por igual, pudiendo causar defoliación o abscisión prematura de las hojas. La fuente de inóculo son las hojarasca contaminadas debajo de los árboles afectados y también se menciona la producción de conidios libres sobre el envés de hojas colonizadas epifíticamente [299]. En las hojas, los síntomas se caracterizan por la aparición temprana de sectores de la lámina foliar más translúcidos que lo normal en coincidencia con la aparición por el envés de grupos de pequeñas ampollas o levantamientos algo salientes, que con el tiempo toman una coloración negruzca y que le dan al envés de las hojas afectadas un aspecto grasoso. En frutos los síntomas son menos frecuentes, excepto en lotes abandonados o afectados por heladas. Se presentan como pequeñas manchas circulares deprimidas, ubicadas preferentemente entre las glándulas de aceite. En plantas con alta incidencia de hojas afectadas, ocurre defoliación y debilitación prematura. Ello se traduce en menores rendimientos y calidad de frutos [302]. El período de incubación de la enfermedad en hoja es de 2 a 3 meses en limón y pomelo, y mayor aún en naranja; en fruto, es de 3-6 meses. La enfermedad puede darse en órganos de cualquier edad, no existiendo un momento determinado de máxima susceptibilidad del hospedante, sin embargo, es más probable que comience en verano dada la mayor tasa de desarrollo del hongo con las altas temperaturas. En este caso, es bueno notar que la infección no está determinada por el período de susceptibilidad sino por las condiciones favorables al hongo [299].



Figura B.4: Lesiones producidas por la Mancha grasienta en hojas (izquierda) y fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia.

#### B.1.4. *Gomosis de los citrus y Podredumbre Parda*

Presente en nuestro país aunque sin datos de distribución, es causada por hongos del género *Phytophthora*, entre ellos *P. parasítica*, *P. citrophthora* y *P. citrícola*. Son oomycetes y por lo tanto altamente dependientes del contenido de agua del suelo. Sus esporas asexuales se forman en esporangios y presentan flagelos que le dan cierta movilidad. Ésta es orientada por un mecanismo de quimiotactismo hacia aberturas naturales o grietas de crecimiento de la planta, por lo que es más probable encontrar su forma infectiva en la rizosfera de las plantas [299]. Lo primero que se observa, es una clorosis (amarillamiento de las copas), que comienza en la parte central de las hojas y se va extendiendo por las nervaduras. Las ramitas exteriores se secan en la parte del árbol que está en relación con las lesiones del pie. Cuando el cancro del pie se extiende más, las plantas van defoliándose, la floración suele ser intensa, originando frutos pequeños y de mala calidad. Estas anomalías se van acentuando con el avance de la enfermedad hasta terminar con la muerte de la planta. Los síntomas típicos se manifiestan al descalzar un poco la planta; por la presencia de canchales localizados en la región del cuello del árbol; por lo general las lesiones tienen origen en las raíces principales, próximas a la superficie, propagándose hacia arriba. La corteza se agrieta y deja escurrir gotitas gomosas, cristalinas, que al principio son de color amarillento, y luego se oscurecen, quedando pegadas al pie de la planta. Si la enfermedad no es tratada a tiempo, el cancro sigue evolucionando hasta rodear totalmente al árbol, siendo un estado muy avanzado de la enfermedad y la muerte del árbol es irremediable. Al microscopio puede observarse un micelio abundante en los espacios intercelulares, el cual provoca la gelificación de la membrana de las células en los tejidos leñosos. Estas gomas van presionando de adentro hacia afuera, hasta lograr salir al exterior en forma de gotitas

gomosas. Si los frutos son atacados sufren una podredumbre seca, parda, con olor alcohólico [303].



Figura B.5: Exudaciones de la gomosis en tronco (izquierda) y podredumbre parda en tronco (derecha).

## B.2. Virales

### B.2.1. *Psorosis*

La psorosis es una enfermedad causada por un virus bicomponente. Se expresa en forma de descascarado de corteza y clorosis en hoja de roble en la brotación de primavera que desaparece conforme la hoja se desarrolla y las temperaturas suben. Se distinguen la psorosis A, menos agresiva, de la psorosis B, que se da en plantas más jóvenes y su síntoma en tronco avanza más rápido por las ramas. Los síntomas se inician generalmente cuando el árbol tiene 10-15 años con pequeñas lesiones en la corteza, que se agrandan paulatinamente hasta cubrir parcial o totalmente el tronco y ramas. Estas lesiones se levantan, se secan y finalmente se van desprendiendo, dando lugar a descamaciones, que son el síntoma más característico de la enfermedad. La psorosis A puede ser identificada en el campo, cuando se producen descamaciones muy localizadas que afectan al tronco y ramas principales mientras que la psorosis B causa descamamiento exuberante en ramas delgadas. Los árboles infectados con los aislados de manchas anulares (ringspot) presentan la típica descamación en tronco y ramas; y se caracterizan por la presencia de manchas cloróticas en hojas y frutos que posteriormente se vuelven amarillentas y pueden tomar forma de anillos. El virus se disemina por el uso de yemas infectadas, o sea, se transmite principalmente por injerto, siendo el material vegetal propagativo la vía primaria de dispersión de psorosis [304]





Figura B.6: Lesiones producidas por la psorosis en citrus. Descamaciones en tronco (izquierda) y clorosis en hojas (derecha).

### B.2.2. *Tristeza*

Es producida por el *Citrus Tristeza clostero Virus*, cuyas variantes difieren en la capacidad de ser vectorizadas y en los síntomas que producen, pero no en sus características serológicas. Infecta el floema, pero en brotes jóvenes puede encontrarse en la corteza. Produce efectos letales en ciertas combinaciones de injertos y portainjertos como naranjo dulce, pomelo y mandarino, injertado en naranjo agrio. Al iniciarse la enfermedad, las hojas se tornan cloróticas, coriáceas con la nervadura central prominente. La brotación se detiene, el follaje se ralea y la planta decae notoriamente. Las plantas atacadas florecen intensamente, pero se forman muy pocas frutas, que no alcanzan su tamaño normal. Con el avance de la enfermedad las hojas se caen, se va muriendo la parte aérea, hasta que finalmente la planta se seca. Todo este proceso ocurre en un lapso de tres a cinco años, según la variedad y raza del virus. En las raíces se produce un proceso de desintegración. Hay necrosis en los tubos cribosos del floema por debajo de la unión del injerto, interrumpiéndose la traslocación de hidratos de carbono [305]. Su transmisión es por injerto, y por el pulgón *Toxoptera citricidus* aunque también lo transmiten: *Aphis gossypii*, *Aphis citricola*, *Toxoptera aurantii*.

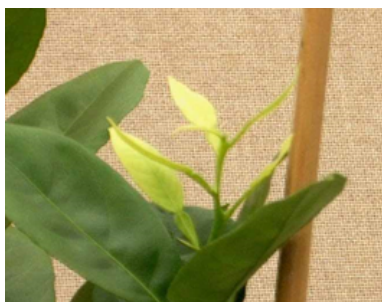


Figura B.7: Síntomas de tristeza en citrus. Amarillamiento en brotes nuevos (izquierda). Estado avanzado de la enfermedad en un ejemplar (derecha).

### B.2.3. *Exocortis*

Es producida por el “Viroide de la Exocortis de los Cítricos”. Se caracteriza por la aparición de escamas y grietas verticales en la corteza, manchas amarillas en los brotes tiernos y enanismo en especies sensibles. Los daños son variables y dependen de la estirpe del patógeno, la edad del árbol en el momento de la infección y las condiciones climáticas de la zona en la que se desarrolla el cultivo, pero afecta a pomelos, naranjas, limones y mandarinas por igual. Las pérdidas económicas se deben fundamentalmente a las bajas producciones en árboles enfermos que alcanzan tamaños menores a los esperados. Las frutas de árboles enfermos pueden ser de mayor tamaño que la de árboles sanos, pero, aun así, aunque la calidad de la fruta no suele verse afectada, las pérdidas en la producción pueden ser hasta de 60 %. El efecto es muy superior en árboles que se han infectado en vivero o en propagaciones llevadas a cabo por el agricultor utilizando yemas infectadas, que en árboles que se infectan durante el cultivo. La principal vía de dispersión es la propagación de yemas portadoras de este viroide. Dado que esta enfermedad se haya ampliamente difundida en la mayoría de especies y variedades antiguas, su dispersión es altamente probable cuando no se toman las precauciones adecuadas. No se conocen vectores, pero la enfermedad se transmite mecánicamente mediante las herramientas de corte y poda [306].



Figura B.8: Síntomas de exocortis en citrus. Agrietamiento de la corteza en tronco (izquierda). Manchas amarillas en brotes y hojas jóvenes (derecha).

## B.3. Bacterianas

### B.3.1. *Cancrosis*

Causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis*, puede ocurrir durante todo el año y afectar plántulas y árboles jóvenes, los cuales generalmente presentan una alta producción de brotes vegetativos, principalmente durante el verano y otoño. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad disminuye cuando los árboles están en plena producción y no ocurre una nueva brotación vegetativa. La severidad de la enfermedad también depende de la especie de cítrico y tipo de cultivar sembrado. Puede causar defoliación severa, muerte de las ramas, y caída prematura de frutos. Los síntomas muestran características muy particulares, lo que favorece su identificación en el campo. Las lesiones son de color pardo bronceado o marrón, circulares, levantadas, acorchadas, con bordes húmedos y halo amarillo, y con apariencia de cráter [307].

La fuente de inóculo son las lesiones de hojas, ramas y frutos. La bacteria es diseminada por el agua libre presente en la superficie del follaje, que al gotear salpica nuevos brotes. Las lluvias acompañadas por vientos incrementan gravemente la dispersión de la enfermedad, debido a que los vientos causan heridas en hojas y ramas de los árboles. La bacteria se puede desplazar hasta distancias mayores a 100 m. en las gotas pequeñas y causar infecciones en árboles vecinos. El riego por aspersión favorece el desarrollo de la enfermedad debido al salpique de agua que puede contener la bacteria. La temperatura máxima de crecimiento es de 35 a 39°C, siendo la óptima 28 a 30°C. El período de incubación varía entre 4 días a 30°C y varias semanas a 15°C y el hospedante reacciona con hipertrofia e hiperplasia y luego formando capas de súber.

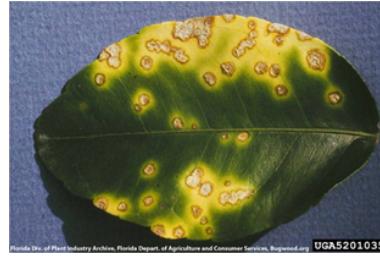


Figura B.9: Síntomas de cancrisis en citrus. Lesiones en frutos (izquierda) y hojas (derecha).

# Índice de figuras

1.1. Proyección sobre la cantidad de diabéticos en el mundo para 2035 según la IDF. . . . .	17
1.2. Valores de la producción mundial de Limones y limas, FAO 2016.	25
1.3. Valores de las exportaciones mundiales de limones y limas acorde a los principales países, FAO 2016. . . . .	26
1.4. Clorosis causada por deficiencia de zinc (izquierda) y deficiencia de magnesio (derecha). . . . .	27
1.5. Manchas producidas por Huanglongbing en hojas (izquierda) y enverdecimiento en frutos (derecha) de naranja dulce. . . . .	28
1.6. Estructura química general de las flavonas y flavanonas . . . . .	33
2.1. Micrografía SEM de PBNPs depositadas sobre un electrodo metálico (izquierda). Estructura cristalina de las PBNPs (derecha). . .	39
2.2. Sensor de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> basado en nanopartículas de MoS <sub>2</sub> . . . . .	45
2.3. <b>A</b> Hoja de óxido de grafeno. <b>B</b> Grafeno funcionalizado con PEI. Este composite fue preparado primero agitando la PEI y el grafeno en KOH a 80°C durante 24 hs. Luego se agregó NaBH <sub>4</sub> a la mezcla y se mantuvo a 80°C durante 2 hs. El nanocomposite resultante se recolectó mediante centrifugación y se lavó con agua destilada.[106] . . . . .	47
2.4. <b>(A)</b> Voltamogramas cíclicos del [PB/PEI-grafeno] <sub>10</sub> multicapa (a) en buffer pH=4, (b) multicapa de [PB/PEI-grafeno] <sub>10</sub> y (c) multicapa de [PB/PEI] <sub>10</sub> en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 mM en buffer. La velocidad de barrido fue de 10 mV/s. <b>(B)</b> Monitoreo espectroscópico del cambio de potencial del film multicapas de [PB/PEI-grafeno] <sub>16</sub> . El cambio ocurrió entre los -0,2 V (PW) y 0,6 V (PB).[106] . . . . .	47

2.5. <b>A</b> Representación esquemática de la preparación del biosensor de bromato y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . <b>B</b> Respuesta amperométrica del electrodo giratorio para cada adición sucesiva de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (condiciones: -0,25 V, PBS pH 7, velocidad de rotación 1200 rpm). Recuadro: cambio de la corriente en función de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . [128] . . .	52
2.6. Esquema del ensamblado del biosensor. Una SAM formada con monotiol-alcano-PEG primero se depositó sobre un electrodo de oro. El elemento de biorreconocimiento se inmovilizó covalentemente sobre la SAM cuando los grupos funcionales de ella, el ácido carboxílico, se activaron usando EDC/NHS. EL bloque de los sitios activos remanentes se hizo con etanolamina. En sensor se probó usando fluidos con el contenido de la proteína humana IL-8. La detección se hizo con EIS. [183] . . . . .	55
2.7. Representación esquemática del inmunosensor electroquímico [192].	57
2.8. Diagrama de un inmunoensayo tipo sandwich que utiliza nanopartículas de Ag/SiO <sub>2</sub> del tipo núcleo-capa usadas como marcador. La matriz de inmovilización son nanopartículas magnéticas cubiertas con de SiO <sub>2</sub> [200]. . . . .	59
2.9. Representación esquemática del inmunosensor [202]. . . . .	59
2.10. Ensayo de LAMP que utiliza susceptometría magnética [203]. . .	60
2.11. La capa de nanocolumnas de ZnO se utilizan para inmovilizar y distribuir los anticuerpos sobre la región activa del biosensor, donde la medición se hace mediante un campo eléctrico [204]. . .	61
2.12. Esquema de la fabricación del inmunosensor cuya estructura es: BSA/r-IgGs/Nano-ZnO/ITO. También se muestra la reacción bioquímica entre la OTA y el inmunosensor [205]. . . . .	61
2.13. Set-up del inmunoensayo sobre una superficie de ZnO donde se usaron DSP y APTES para inmovilizar sobre la superficie anticuerpos anti-troponin-T. [206]. . . . .	62
3.1. (A) Celda tripolar de medición y (B) el Biosensor . . . . .	68
3.2. Izquierda: Imágenes SEM de las ZnO NPs usadas y Derecha: la mezcla de GOx con las NPs depositadas sobre la CP . . . . .	68
3.3. Respuesta normalizada del biosensor sólo con enzima GOx (símbolos rojos), y biosensor con GOx + NPs de ZnO (símbolos azules), donde (A) corresponde al módulo de Z y (B) a la fase. . . . .	69

3.4.	Respuesta normalizada de la fase del biosensor con enzima GOx + NPs ZnO frente a agregados de baja concentración de glucosa. . . . .	70
3.5.	Repetición de los ensayos luego de 8 días. Donde (A) y (B) corresponden al módulo y fase. . . . .	70
4.1.	Estructura asumida del modelo de conducción de los ZnO TFs con las diferentes vías de conducción. Cada grano (G) se modela con un circuito RC paralelo, un circuito similar se utiliza para los bordes de grano (GB). El camino de conducción total se modela como el equivalente de dos circuitos en serie [219]. . . . .	76
4.2.	Difractograma XRD de los TF crecidos a 700 °C (izquierda) y 600 °C (derecha) con orientación predominante en el eje c. . . . .	76
4.3.	Micrografías SEM obtenida perpendicular al ZnO TF crecido sobre sustrato de zafiro con eje preferencial c. En el recuadro se muestra la vista de canto del TF. . . . .	77
4.4.	Diagrama de los contactos sobre la superficie del film. . . . .	78
4.5.	Esquema del procedimiento experimental. El área de la gota sobre los TFs fue siempre aproximadamente de 2 mm <sup>2</sup> . . . . .	78
4.6.	Típico diagrama Cole-Cole de un TF de ZnO con el correspondiente modelo circuital. Los datos experimentales se muestran en círculos y el ajuste en la línea continua. . . . .	79
4.7.	Resultados de la impedancimetría de cinco barras de TFs (TF21-5) obtenidas de la misma muestra. En el recuadro se muestra una ampliación de la gráfica de impedancia de dos TFs diferentes con valores cercanos entre ellos. . . . .	80
4.8.	Diagramas Cole-Cole de los TFs (crecidos a 700 °C) a distintos tiempos luego de apagar la fuente de luz visible. Los TFs fueron irradiados durante 1 hora antes de cada medición. . . . .	81
4.9.	Comparación de la Parte real (Zr) e imaginaria (Zi) de las mediciones de impedancia del TF con PBS y glucosa 3 mM a una frecuencia y 11 minutos de puesto el agregado. . . . .	82
5.1.	Esquema de las ZnO NPs enlazadas a la SAMP 1 sobre el electrodo de oro. La figura no se encuentra a escala. . . . .	87
5.2.	Análisis del XPS de las muestras modificadas con SAMP 1 (rojo), SAM 2 (verde) y oro (negro). El contenido superficial de carbono, azufre y fósforo se muestran respectivamente en <b>a</b> , <b>b</b> and <b>c</b> . . . . .	89

5.3. Ángulo de contacto estático de la SAMP 1 (izquierda) y SAM 2 (derecha). . . . .	90
5.4. Análisis del contenido de Zn luego de depositar las NPs, donde SAMP 1 es la curva en rojo, SAM 2 la verde y el oro la curva negra.	91
5.5. Micrografías SEM de: a) NPs de ZnO sobre Silicio, b) electrodo con SAM 2, c) y d) dos magnificaciones del electrodo con SAM 1 y ZnO NPs. . . . .	92
5.6. Voltagramas a 5 mV/s . . . . .	93
5.7. Diagrama de Nyquist en 1 mM Ferro/Ferri . . . . .	93
5.8. Voltagramas a 5 mV/s . . . . .	94
5.9. Pico de la corriente vs. la raíz cuadrada de la velocidad de barrido	94
5.10. Diagramas de Nyquist en 1 mM Ferro/Ferri . . . . .	96
6.1. Espectros UV-vis de los precursores (negro), PBNPs (azul) y el coef. de extinción molar (rojo). . . . .	102
6.2. Micrografías SEM de las PBNPs. a) PBNPs sobre electrodo de oro, b) PBNPs sobre electrodo de EIROF. . . . .	102
6.3. Distribución de tamaños de las PBNPs. . . . .	102
6.4. Voltagramas de: a) Au + PBNPs b) Au + EIROF h and c) Au + EIROF + PBNPs en presencia de 150 $\mu$ M of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (rojo) y en negro lo medido en PBS. . . . .	103
6.5. Variación de la corriente en porcentaje al agregar 150 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	105
6.6. Voltagramas de dos concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 150 $\mu$ M (rojo) y 300 $\mu$ M (azul). . . . .	106
6.7. Diagrama de Nyquist de los 4 electrodos utilizados. En el recuadro se muestra la respuesta EIS de menores valores. . . . .	106
6.8. Respuesta de los electrodos al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	108
6.9. Curvas de calibraciones de ambos electrodos. . . . .	109
6.10. Electrodo de oro con PBNPs. Izquierda: PMN del módulo de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para f= 54.1 kHz. . . . .	110
6.11. Electrodo de oro con PBNPs. Izquierda: PMN de la fase de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para f= 54.1 kHz. . . . .	110
6.12. Electrodo de EIROF con PBNPs. Izquierda: PMN del módulo de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para f= 54.1 kHz. . . . .	111



6.13. Electrodo de EIROF con PBNPs. Izquierda: PMN de la fase de Z en función de la frecuencia. Derecha: curva de calibración para $f=54.1$ kHz. . . . .	111
6.14. Agregados cíclicos de $10 \mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ alternando con PBS. Donde la zona sombreada marca la dispersión alrededor de la respuesta porcentual promedio de los agregados. . . . .	112
6.15. Agregados cíclicos de $1 \mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ alternando con PBS. Donde la zona sombreada marca la dispersión alrededor de la respuesta porcentual promedio de los agregados. . . . .	112
6.16. Promedio y desviación estándar de la medición en PBS y con $\text{H}_2\text{O}_2$ para el electrodo de oro (izquierda) y EIROF (derecha) con PBNPs. . . . .	112
6.17. Cambio porcentual de la corriente ( $I[\%]$ ) en función del tiempo al agregar $1 \mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ y $10 \mu\text{M}$ de ácido ascórbico (a los 400 [s]).	113
7.1. Voltametría cíclica de los electrodos E1 (izquierda) y E2 (derecha) en PBS. . . . .	119
7.2. Mediciones amperométricas del electrodo de Pt para ambos rangos de concentración de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	120
7.3. Curvas de calibración del electrodo de Pt para ambos rangos de concentración de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	120
7.4. Respuesta de la corriente en el tiempo del electrodo E1 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	120
7.5. Curvas de calibración del electrodo E1 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	121
7.6. Respuesta de la corriente en el tiempo del electrodo E2 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	121
7.7. Curvas de calibración del electrodo E2 para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	121
7.8. $i_{ss}$ de ambos electrodos para el rango bajo (izquierda) y alto (derecha) de concentraciones de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	122
8.1. Flavonoides empleados en el estudio de la HRP. . . . .	128
8.2. Cuantificación de fenoles totales por Folin-Ciocalteu. . . . .	130
8.3. Grado de inhibición de la HRP vs. concentración de flavonoide. . . . .	131
8.4. Disminución de la actividad enzimática debido a la presencia de polifenoles totales en tallos de plantas de limones y naranjas. . . . .	132

8.5. Perfiles cromatográficos de extractos de hojas de plantas de limon y naranja. . . . .	132
8.6. Cambios en la actividad de la HRP cuando se incubaba a distintos tiempos el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con Quercetin, Herpsridin y Naringenin. . . . .	133
8.7. Cambios en la actividad de la HRP cuando se incubaba a distintos tiempos el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con extractos reales de hojas de Naranja y Limón. . . . .	133
8.8. Inhibición enzimática con extractos reales y agregados artificiales de los flavonoides. . . . .	134
8.9. Evaluación de extractos de una planta sana y enferma con cancrrosis. . . . .	135
8.10. Hojas recolectadas de plantas sanas. . . . .	135
8.11. Hojas recolectadas de plantas a un año de haberse infectado con HLB. . . . .	136
8.12. Ensayo con plantas sanas y con HLB. Al extremo izquierdo se puede observar el tubo control sin extracto. La fila superior corresponde a los extractos de planta sana y la inferior a la infectada con HLB. De izquierda a derecha se encuentran los tiempos de extracción, 5, 10, 30 y 45 minutos respectivamente. . . . .	136
8.13. Descripción gráfica del proceso de extracción rápida. . . . .	137
8.14. Extracción de 10 minutos de hojas de Limón. . . . .	137
8.15. Extracción de 10 minutos de hojas de Limón. . . . .	138
8.16. Extracción de 15 minutos de hojas de Limón. . . . .	138
8.17. Extracción de 15 minutos de hojas de Naranja. . . . .	138
9.1. Tiras de PET lijadas, preparadas según el método 2.4.5 (chitosan 0,5 % y 1 % con nanopartículas de TiO <sub>2</sub> ); antes (izq.) y después (der.) de las pruebas de color. . . . .	150
9.2. Velocidad máxima de reacción vs. concentración de HRP. El inset muestra la recta de calibración para los tres primeros puntos. . . . .	151
9.3. Grado de inhibición enzimática en función de la concentración del Quercetin . . . . .	152
9.4. Curvas de inhibición para la determinación de la Ic <sub>50</sub> para el Quercetin (derecha) y Hesperidin (izquierda). . . . .	153
9.5. Actividad enzimática en presencia de distintos extractos reales de hojas de cítricos. . . . .	153

A.1. Ensayo Dot blot de diferentes cantidades de NPTII (0, 2, 5, 10 and 20 ng) sobre membrana de nitrocelulosa. Esto fue detectado mediante la unión de un anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG marcado con HRP al anticuerpo policlonal Anti-NPTII. . . . .	162
B.1. Lesiones producidas por la Sarna de los citrus en hojas (izquierda) fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia. . . . .	164
B.2. Lesiones producidas por la Sarna del naranjo dulce en hojas (izquierda),y fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia. . . . .	165
B.3. Síntomas de melanosis en fruta (izquierda), y hoja (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia. . . . .	166
B.4. Lesiones producidas por la Mancha grasienta en hojas (izquierda) y fruta (derecha) de un ejemplar de Naranja Valencia. . . . .	167
B.5. Exudaciones de la gomosis en tronco (izquierda) y podredumbre parda en tronco (derecha). . . . .	168
B.6. Lesiones producidas por la psorosis en citrus. Descamaciones en tronco (izquierda) y clorosis en hojas (derecha). . . . .	169
B.7. Síntomas de tristeza en citrus. Amarillamiento en brotes nuevos (izquierda). Estado avanzado de la enfermedad en un ejemplar (derecha). . . . .	170
B.8. Síntomas de exocortis en citrus. Agrietamiento de la corteza en tronco (izquierda). Manchas amarillas en brotes y hojas jóvenes (derecha). . . . .	171
B.9. Síntomas de cancrrosis en citrus. Lesiones en frutos (izquierda) y hojas (derecha). . . . .	172

# Índice de cuadros

2.1. Hexacianoferratos metálicos <sup>b</sup> . . . . .	40
2.2. Sensores de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> basados en nanosestrucuras metálicas . . . . .	42
2.3. Sensores basados en nanosestrucuras de óxidos metálicos . . . . .	44
2.4. Sensores basados en nanoestructuras mixtas . . . . .	46
2.5. Biosensores de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> basados en biomoléculas . . . . .	49
3.1. Características físico-químicas de las ZnO NPs . . . . .	66
3.2. Sensibilidad del biosensor . . . . .	69
3.3. Sensibilidad del biosensor en la repetición . . . . .	71
4.1. Circuitos equivalentes utilizados para el ajuste de las mediciones impedancimétricas. . . . .	79
5.1. Relación entre los picos Anódicos y Catódicos de la corriente. . . . .	95
6.1. Variación de la Carga en los tres electrodos . . . . .	103
6.2. Valores de los componentes de los circ. equivalentes . . . . .	107
6.3. Tabla 3 . . . . .	114
7.1. Sensibilidades de los electrodos de Pt, E1 y E2 . . . . .	122
9.1. Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por celda . . . . .	147
9.2. Concentración de Quercetin por celda . . . . .	149
9.3. Concentración de Quercetin por celda . . . . .	149
9.4. Nombres otorgados a las muestras de extractos reales . . . . .	149
9.5. Actividad enzimática con extractos reales . . . . .	154

# Bibliografía

- [1] Marisa A Sánchez, Diego Schneider, Dpto De Ciencias, De Administración, Universidad Nacional, Dpto De Matemática, and Universidad Nacional. Prevalencia de la Diabetes en la República Argentina : Proyecciones Utilizando Simulación Dinámica. In *Congreso Argentino de Informática y Salud*, pages 3057–3064, CABA - Argentina, 2010.
- [2] Juan José Garza-Saldaña, Sóstenes Varela-Fuentes, and Wilfrido Gómez-Flores. Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing ( HLB ) en cítricos. *CienciaUAT*, 11(2):93–104, 2017.
- [3] J M Bove, De Recherche Genomique, Pouvoir Pathogene, Centre De Recherche, Inra De Bordeaux, Edouard Bourlaux, Ornon Cedex, Av Df, Adhemar Pereira, and P Araraquara. HUANGLONGBING : A DESTRUCTIVE , NEWLY-EMERGING , CENTURY · OLD DISEASE OF CITRUS. 88:7–37, 2006.
- [4] Diva do Carmo Teixeira, Colette Saillard, Sandrine Eveillard, Jean Luc Danet, Paulo Inácio da Costa, Antonio Juliano Ayres, and Joseph Bové. ‘Candidatus Liberibacter americanus’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5):1857–1862, 2005.
- [5] Héctor Mara and Mercedes Peyrou. Informe Ejecutivo de Consultoría LA CITRICULTURA DE ARGENTINA Y URUGUAY PUEDE ESCAPAR A. Technical report, 2010.
- [6] Tim R. Gottwald. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual review of phytopathology*, 48:119–139, 2010.
- [7] Roberto Arredondo Valdés, Juan Carlos Delgado Ortiz, Mariana Beltrán Beache, Julia Anaguiano Cabello, Ernesto Cerna Chavez, Yolanda Rodriguez Pagaza, and YISA OCHOA. A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Canadian Journal of Microbiology*, 811(June):cjm–2016–0022, 2016.
- [8] Svetlana Y Folimonova and Diann S Achor. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100(9):949–958, 2010.
- [9] Juan Manuel Cevallos-Cevallos, Rosalía García-Torres, Edgardo Etxeberria, and José Ignacio Reyes-De-Corcuera. GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus huanglongbing and zinc deficiency in leaves of ‘Valencia’ sweet orange from commercial groves. *Phytochemical Analysis*, 22(3):236–246, 2011.

- [10] Sindhuja Sankaran, Ashish Mishra, Reza Ehsani, and Cristina Davis. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture*, 72(1):1–13, 2010.
- [11] Takashi Fujikawa and Toru Iwanami. Sensitive and robust detection of citrus greening (huanglongbing) bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* by DNA amplification with new 16S rDNA-specific primers. *Molecular and Cellular Probes*, 26(5):194–197, 2012.
- [12] J. Kent Morgan, Lijuan Zhou, Wenbin Li, Robert G. Shatters, Manjunath Keremane, and Yong Ping Duan. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes*, 26(2):90–98, 2012.
- [13] Hong-Ji SU Ting-Hsuan HUNG, Meng-Ling WU. Detection of Fastidious Bacteria Causing Citrus Greening Disease by Nonradioactive DNA Probes. *Japanese Journal of Phytopathology*, 65(2):140–146, 1999.
- [14] M Futch, S., Weingarten, S., and Irey. Determining HLB infection levels using multiple survey methods in Florida citrus. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pages 152–157, 2009.
- [15] Deborah E. Purcell, Michael G. O'shea, Robert A. Johnson, and Serge Kokot. Near-infrared spectroscopy for the prediction of disease ratings for fiji leaf gall in sugarcane clones. *Applied Spectroscopy*, 63(4):450–457, 2009.
- [16] Sindhuja Sankaran and Reza Ehsani. Visible-near infrared spectroscopy based citrus greening detection: Evaluation of spectral feature extraction techniques. *Crop Protection*, 30(11):1508–1513, 2011.
- [17] Ute Albrecht and Kim D Bowman. Plant Science Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. 175:291–306, 2008.
- [18] Juan M. Cevallos-Cevallos, David B. Futch, Turksen Shilts, Svetlana Y. Folimonova, and Jos?? I. Reyes-De-Corcuera. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53:69–76, 2012.
- [19] Luciano A Rigano, Florencia Malamud, Ingrid G Orce, Maria P Filippone, Maria R Marano, Alexandre do Amaral, Atilio P Castagnaro, and Adrian A Vojnov. Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology*, 14(1):86, 2014.
- [20] Yulu Xia, Gecheng Ouyang, Ronald a. Sequeira, Ronald Sequeira, Yu Sequeira, Ignacio Baez, and Jianchi Chen. A Review of Huanglongbing (Citrus Greening) Management in Citrus Using Nutritional Approaches in China. *Plant Health Progress*, (June), 2011.

- [21] Krishna Prasad Paudyal. Technological Advances in Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening Disease Management. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, Vol. 1, 1(1):41–50, 2015.
- [22] D Farnsworth, Ka Grogan, AHC van Bruggen, and Charles B Moss. The Potential Economic Cost and Response to Greening in Florida Citrus. *Choices*, 29(3):1–6, 2014.
- [23] Sergio Alvarez, Eric Rohrig, Daniel Solís, and Michael H. Thomas. Citrus Greening Disease (Huanglongbing) in Florida: Economic Impact, Management and the Potential for Biological Control. *Agricultural Research*, 5(2):109–118, 2016.
- [24] Muqing Zhang, Ying Guo, Charles A. Powell, Melissa S. Doud, Chuanyu Yang, and Yongping Duan. Effective antibiotics against 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLoS ONE*, 9(11):1–10, 2014.
- [25] Eduardo Canales, Yamilet Coll, Ingrid Hernández, Roxana Portieles, Mayra Rodríguez García, Yúnior López, Miguel Aranguren, Eugenio Alonso, Roger Delgado, Maritza Luis, Lochy Batista, Camilo Paredes, Meilyn Rodríguez, Merardo Pujol, María Elena Ochagavía, Viviana Falcón, Ryohei Terauchi, Hideo Matsumura, Camilo Ayra-Pardo, Raixa Llauger, María Del Carmen Pérez, Mirian Núñez, Melissa S. Borrusch, Jonathan D. Walton, Yussuan Silva, Eulogio Pimentel, Carlos Borroto, and Orlando Borrás-Hidalgo. 'Candidatus Liberibacter asiaticus', causal agent of citrus huanglongbing, is reduced by treatment with brassinosteroids. *PLoS ONE*, 11(1):1–10, 2016.
- [26] Parolin Stuchi, E.S., Reiff, E.T., Sempionato, O.R., Cantuarias-Avilés, T., Girardi, E, A. and D.A. L.G., Toledo. Rootstocks and pruning effects on Huanglongbing incidence on Tahiti Limes in Bebedouro, Northern São Paulo State, Brazil. In *Proceedings of 2nd International Research Conference on Huanglongbing*, page 204, 2011.
- [27] Ute Albrecht and Kim D. Bowman. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to Candidatus Liberibacter asiaticus. *Scientia Horticulturae*, 147:71–80, 2012.
- [28] Charles S. Buer, Nijat Imin, and Michael A. Djordjevic. Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1):98–111, 2010.
- [29] Jeffrey B. Harborne and Christine A. Williams. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6):481–504, 2000.
- [30] Justyna Mierziak, Kamil Kostyn, and Anna Kulma. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19(10):16240–16265, 2014.
- [31] Everett C Hurdis and Hendrik Romeyn. Accuracy of Determination of Hydrogen Peroxide by Cerate Oxidimetry. *Analytical chemistry*, 26(2):320–325, 1954.
- [32] Chiyo Matsubara, Naoki Kawamoto, and Kiyoko Takamura. Oxo[5, 10, 15, 20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV): an ultra-high sensitivity spectrophotometric reagent for hydrogen peroxide. *The Analyst*, 117(11):1781, 1992.

- [33] Weiwei Chen, Baoxin Li, Chunli Xu, and Lei Wang. Chemiluminescence flow biosensor for hydrogen peroxide using DNAzyme immobilized on eggshell membrane as a thermally stable biocatalyst. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8):2534–2540, 2009.
- [34] Andrew Mills, Cheryl Tommons, Raymond T Bailey, M Catriona Tedford, and Peter J Crilly. Reversible, fluorescence-based optical sensor for hydrogen peroxide. *The Analyst*, 132(6):566–71, 2007.
- [35] K. Nakashima, M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, and K. Imai. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Hydrogen Peroxide with Peroxyoxalate Chemiluminescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 17(10):2111–2126, 1994.
- [36] M G Garguilo, N Huynh, a Proctor, and a C Michael. Amperometric sensors for peroxide, choline, and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer. *Analytical chemistry*, 65(5):523–528, 1993.
- [37] Xueji Zhang, Huangxian Ju, and Joseph Wang, editors. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. Academic Press, 1st editio edition, 2007.
- [38] A J Saleh Ahammad. Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin. pages 1–11, 2013.
- [39] Wei Han Hsiao, Hsin Yu Chen, Ta Ming Cheng, Ting Kai Huang, Yu Liang Chen, Chi Young Lee, and Hsin Tien Chiu. Urchin-like Ag nanowires as non-enzymatic hydrogen peroxide sensor. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 59(4):500–506, 2012.
- [40] Arkady A. Karyakin, Elena E. Karyakina, and Lo Gorton. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta*, 43(9):1597–1606, 1996.
- [41] Ning Li, Xiaodi Su, and Yi Lu. Nanomaterial-based biosensors using dual transducing elements for solution phase detection. *The Analyst*, 140(9):2916–2943, 2015.
- [42] David A Armbruster and Terry Pry. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 29 Suppl 1(August):S49–52, 2008.
- [43] Edson Nossol and Aldo J G Zarbin. A simple and innovative route to prepare a novel carbon nanotube/prussian blue electrode and its utilization as a highly sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric sensor. *Advanced Functional Materials*, 19(24):3980–3986, 2009.
- [44] Qinglin Sheng, Dan Zhang, Qian Wu, Jianbin Zheng, and Hongsheng Tang. Electrodeposition of Prussian blue nanoparticles on polyaniline coated halloysite nanotubes for nonenzymatic hydrogen peroxide sensing. *Anal. Methods*, 7(16):6896–6903, 2015.
- [45] Ivanildo Luiz De Mattos, Lo G Orton, Tautgirdas R Uzgas, Arkady A K Aryakin, Departamento De Química, Faculdade De Ciências, and P O Box. Sensor for Hydrogen Peroxide Based on Prussian Blue Modified Electrode : Improvement of the Operational Stability. *Analytical Sciences*, 16(August):795–798, 2000.



- [46] Mohammadre Shokouhimehr. Prussian Blue Nanoparticles and its Analogues as New-Generation T1-Weighted MRI Contrast Agents for Cellular Imaging. pages 1–93, 2010.
- [47] Aa Karyakin. Prussian blue-based first-generation biosensor. A sensitive amperometric electrode for glucose. *Analytical Chemistry*, 67(14):2419–2423, 1995.
- [48] Mihaela Buleandra, Andreea Alexandra Rabinca, Constantin Mihailciuc, Adriana Balan, Cornelia Nichita, Ioan Stamatina, and Anton Alexandru Ciucu. Screen-printed Prussian Blue modified electrode for simultaneous detection of hydroquinone and catechol. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 203:824–832, 2014.
- [49] Meng Lin, Jiao Yang, Misuk Cho, and Youngkwan Lee. Hydrogen peroxide detection using a polypyrrole/Prussian blue nanowire modified electrode. *Macromolecular Research*, 19(7):673–678, 2011.
- [50] Francesco Ricci, Giuseppe Palleschi, Yirgalem Yigzaw, Lo Gorton, Tautgirdas Ruzgas, and Arkady Karyakin. Investigation of the effect of different glassy carbon materials on the performance of Prussian Blue based sensors for hydrogen peroxide. *Electroanalysis*, 15(3):175–182, 2003.
- [51] R. Garjonyte and A. Malinauskas. Operational stability of amperometric hydrogen peroxide sensors, based on ferrous and copper hexacyanoferrates. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 56(1):93–97, 1999.
- [52] Arkady A Karyakin, Elena E Karyakina, and Lo Gorton. On the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 1(2):78–82, 1999.
- [53] A. Malinauskas, R. Araminaite, G. Mickevičiute, and R. Garjonyte. Evaluation of operational stability of Prussian blue- and cobalt hexacyanoferrate-based amperometric hydrogen peroxide sensors for biosensing application. *Materials Science and Engineering C*, 24(4):513–519, 2004.
- [54] Lijuan Han, Simon Tricard, Jian Fang, Jihua Zhao, and Weiguo Shen. Prussian blue @ platinum nanoparticles/graphite felt nanocomposite electrodes: Application as hydrogen peroxide sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 43(1):120–124, 2013.
- [55] Stefano Cinti, Fabiana Arduini, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi, and Anthony J. Killard. Development of a hydrogen peroxide sensor based on screen-printed electrodes modified with inkjet-printed Prussian blue nanoparticles. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(8):14222–14234, 2014.
- [56] Xiang Zhu, Xiangheng Niu, Hongli Zhao, and Minbo Lan. Doping ionic liquid into Prussian blue-multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed electrode to enhance the nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing performance. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 195:274–280, 2014.

- [57] Ivanildo Luiz De Mattos, Lo Gorton, Thomas Laurell, A. Malinauskas, and Arkady A. Karyakin. Development of biosensors based on hexacyanoferrates. *Talanta*, 52(5):791–799, 2000.
- [58] P Ni, Y Zhang, Y Sun, Y Shi, H Dai, J Hu, and Z Li. Facile synthesis of Prussian blue @ gold nanocomposite for nonenzymatic detection of hydrogen peroxide. *RSC Advances*, 3(36):15987–15992, 2013.
- [59] Hua Zhang, Qi Gao, and Huaixiang Li. A novel photoelectrochemical hydrogen peroxide sensor based on nickel(II)-potassium hexacyanoferrate-graphene hybrid materials modified n-silicon electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20(6):1565–1573, 2016.
- [60] Frank N. Crespilho, M. Emilia Ghica, Carla Gouveia-Caridade, Osvaldo N. Oliveira, and Christopher M A Brett. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. *Talanta*, 76(4):922–928, 2008.
- [61] Jinchun Li, Yuzhou Jiang, Yunyun Zhai, Haiqing Liu, and Lei Li. Prussian Blue/Reduced Graphene Oxide Composite for the Amperometric Determination of Dopamine and Hydrogen Peroxide. *Analytical Letters*, 48(17):2786–2798, 2015.
- [62] Jyh Myng Zen, Annamalai Senthil Kumar, and Ching Rue Chung. A glucose biosensor employing a stable artificial peroxidase based on ruthenium purple anchored cinder. *Analytical Chemistry*, 75(11):2703–2709, 2003.
- [63] Suling Yang, Gang Li, Guifang Wang, Junhong Zhao, Meifang Hu, and Lingbo Qu. A novel nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on cobalt hexacyanoferrate nanoparticles and graphene composite modified electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 208:593–599, 2015.
- [64] Jie Lin, Dao Min Zhou, Samo B. Hocevar, Eric T. McAdams, Bozidar Ogorevc, and Xueji Zhang. Nickel hexacyanoferrate modified screen-printed carbon electrode for sensitive detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide. *Frontiers in Bioscience*, 10(1):483–491, 2005.
- [65] Wei Zhang, Guangfeng Wang, Xiaojun Zhang, and Bin Fang. Amperometric detection of hydrogen peroxide using glassy carbon electrodes modified with chromium hexacyanoferrate/single-walled carbon nanotube nanocomposites. *Electroanalysis*, 21(2):179–183, 2009.
- [66] Scherrine A. Tria, David Lopez-Ferber, Catherine Gonzalez, Ingrid Bazin, and Anthony Guiseppi-Elie. Microfabricated biosensor for the simultaneous amperometric and luminescence detection and monitoring of Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 79:835–842, 2016.
- [67] Carmen C. Mayorga Martinez, Ernesto F. Treo, Rossana E. Madrid, and Carmelo C. Felice. Evaluation of chrono-impedance technique as transduction method for a carbon paste/glucose oxidase (CP/GOx) based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4):1239–1244, 2010.

- [68] Ying Wang, Wanzhi Wei, Jinxiang Zeng, Xiaoying Liu, and Xiandong Zeng. Fabrication of a copper nanoparticle/chitosan/carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Microchimica Acta*, 160(1-2):253–260, 2008.
- [69] J Wang, Gang Chen, Mei Wang, and MP Chatrathi. Carbon-nanotube/copper composite electrodes for capillary electrophoresis microchip detection of carbohydrates. *Analyst*, 129:512–512, 2004.
- [70] Yan Wang, Hongyan Yuan, Xulin Lu, Zaide Zhou, and Dan Xiao. All solid-state pH electrode based on titanium nitride sensitive film. *Electroanalysis*, 18(15):1493–1498, 2006.
- [71] Shanmu Dong, Xiao Chen, Lin Gu, Lixue Zhang, Xinhong Zhou, Zhihong Liu, Pengxian Han, Hongxia Xu, Jianhua Yao, Xiaoying Zhang, Lanfeng Li, Chaoqun Shang, and Guanglei Cui. A biocompatible titanium nitride nanorods derived nanostructured electrode for biosensing and bioelectrochemical energy conversion. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10):4088–4094, 2011.
- [72] Joo Heon Lee, Buu-Chau Huynh-Nguyen, Euna Ko, Ji Hye Kim, and Gi Hun Seong. Fabrication of flexible, transparent silver nanowire electrodes for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224:789–797, 2016.
- [73] Sudip Chakraborty and C. Retna Raj. Pt nanoparticle-based highly sensitive platform for the enzyme-free amperometric sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11):3264–3268, 2009.
- [74] Albert Gutes, Ian Laboriante, Carlo Carraro, and Roya Maboudian. Palladium nanostructures from galvanic displacement as hydrogen peroxide sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 147(2):681–686, 2010.
- [75] Yuan Zhang, Metini Janyasupab, Chen-Wei Liu, Po-Yuan Lin, Kuan-Wen Wang, Jiaqiang Xu, and Chung-Chiun Liu. Improvement of amperometric biosensor performance for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection based on bimetallic PtM (M = Ru, Au, and Ir) nanoparticles. *International Journal of Electrochemistry*, 2012:1–8, 2012.
- [76] Qi Le Li and Shou Nian Ding. Double signal amplification sandwich-structured immunosensor based on TiO<sub>2</sub> nanoparticles enhanced CdSe@ZnS QDs electrochemiluminescence and the dramatic quenching effect of Au@polydopamine nanoparticles. *Science Bulletin*, 61(12):931–938, 2016.
- [77] Zheng Xie, Xiangxuan Liu, Weipeng Wang, Can Liu, Zhengcao Li, and Zhengjun Zhang. Fabrication of TiN nanostructure as a hydrogen peroxide sensor by oblique angle deposition. *Nanoscale Research Letters*, 9(1):105, 2014.
- [78] Sabahudin Hrapovic, Yali Liu, Keith B Male, and John H T Luong. Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes interactions with Pt nanoparticles to form a network that connected Pt nanoparticles to the electrode surface. TEM nanoparticles on carbon nanotubes whereas cyclic volta-. *Analytical Chemistry*, 76(4):1083–1088, 2004.

- [79] Qing Kang, Lixia Yang, and Qingyun Cai. An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt-Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. *Bioelectrochemistry*, 74(1):62–65, 2008.
- [80] Xiaoli Cui, Zhizhou Li, Yanchao Yang, Wei Zhang, and Qingfei Wang. Low-potential sensitive hydrogen peroxide detection based on nanotubular TiO<sub>2</sub> and platinum composite electrode. *Electroanalysis*, 20(9):970–975, 2008.
- [81] Huihui Chen, Zhe Zhang, Dongqing Cai, Shengyi Zhang, Bailin Zhang, Jilin Tang, and Zhengyan Wu. A hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles electrodeposited on natural nano-structure attapulgite modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 86(1):266–270, 2011.
- [82] Benzhi Liu and Min Wang. Electrodeposition of dendritic silver nanostructures and their application as hydrogen peroxide sensor. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(6):8572–8578, 2013.
- [83] Wenbo Lu, Guohui Chang, Yonglan Luo, Fang Liao, and Xuping Sun. Method for effective immobilization of Ag nanoparticles/graphene oxide composites on single-stranded DNA modified gold electrode for enzymeless H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Journal of Materials Science*, 46(15):5260–5266, 2011.
- [84] Sophia J. and Muralidharan G. Amperometric sensing of hydrogen peroxide using glassy carbon electrode modified with copper nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 70:315–320, 2015.
- [85] Otto S. Wolfbeis, Axel Dürkop, Meng Wu, and Zhihong Lin. A europium-ion-based luminescent sensing probe for hydrogen peroxide. *Angewandte Chemie - International Edition*, 41(23):4495–4498, 2002.
- [86] Lilia C. Courrol, Maria H. Bellini, Luiz V G Tarelho, Flávia R O Silva, Ronaldo D. Mansano, Laércio Gomes, Nilson D. Vieira, and Nestor Shor. Urea hydrogen peroxide determination in whole blood using europium tetracycline probe. *Analytical Biochemistry*, 355(1):140–144, 2006.
- [87] Lingjun Kong, Zhiyu Ren, Nannan Zheng, Shichao Du, Jun Wu, Jingling Tang, and Honggang Fu. Interconnected 1D Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanowires on reduced graphene oxide for enzymeless H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Nano Research*, 8(2):469–480, 2015.
- [88] Halima Begum, Mohammad Shamsuddin Ahmed, and Seungwon Jeon. A novel  $\delta$ -MnO<sub>2</sub> with carbon nanotubes nanocomposite as an enzyme-free sensor for hydrogen peroxide electro-sensing. *RSC Adv.*, 6(56):50572–50580, 2016.
- [89] Kian Keat Lee, Pui Yee Loh, Chorng Haur Sow, and Wee Shong Chin. CoOOH nanosheet electrodes: Simple fabrication for sensitive electrochemical sensing of hydrogen peroxide and hydrazine. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1):255–260, 2013.

- [90] Sher Bahadar Khan, Mohammed M. Rahman, Abdullah M. Asiri, Safi Asim Bin Asif, Sara Abdullah S Al-Qarni, Abdullah G. Al-Sehemi, Saleh A. Al-Sayari, and Mohammad Sultan Al-Assiri. Fabrication of non-enzymatic sensor using Co doped ZnO nanoparticles as a marker of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 62:21–27, 2014.
- [91] Yu Jung Chang, Arun Prakash Periasamy, and Shen Ming Chen. Poly (toluidine blue) and zirconia nanoparticles electrochemically deposited at gelatin-multiwalled carbon nanotube film for amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor. *International Journal of Electrochemical Science*, 6(9):4188–4203, 2011.
- [92] Li Zhang, Hua Li, Yonghong Ni, Jun Li, Kaiming Liao, and Guangchao Zhao. Porous cuprous oxide microcubes for non-enzymatic amperometric hydrogen peroxide and glucose sensing. *Electrochemistry Communications*, 11(4):812–815, 2009.
- [93] Limiao Li, Zhifeng Du, Shuang Liu, Quanyi Hao, Yanguo Wang, Qiuhong Li, and Taihong Wang. A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on MnO<sub>2</sub>/graphene oxide nanocomposite. *Talanta*, 82(5):1637–1641, 2010.
- [94] Li Zhang, Yonghong Ni, Xinghong Wang, and Guangchao Zhao. Direct electrocatalytic oxidation of nitric oxide and reduction of hydrogen peroxide based on alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles-chitosan composite. *Talanta*, 82(1):196–201, 2010.
- [95] Xiaohong Shu, Ying Chen, Hongyan Yuan, Shangfeng Gao, and Dan Xiao. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensor Based on the Room-Temperature Phosphorescence of Nano TiO<sub>2</sub> / SiO<sub>2</sub> Composite. *Anal. Chem.*, 79(10):3695–3702, 2007.
- [96] Li Zhang, Feifei Yuan, Xiaohu Zhang, and Liming Yang. Facile synthesis of flower like copper oxide and their application to hydrogen peroxide and nitrite sensing. *Chemistry Central journal*, 5(1):75, 2011.
- [97] Zhong Liu, Baoliang Lv, Yao Xu, and Dong Wu. Hexagonal [small alpha]-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorods bound by high-index facets as high-performance electrochemical sensor. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(9):3040–3046, 2013.
- [98] Tanyuan Wang, Haichuan Zhu, Junqiao Zhuo, Zhiwei Zhu, Pagona Papakonstantinou, Gennady Lubarsky, Jian Lin, and Meixian Li. Biosensor based on ultrasmall MoS<sub>2</sub> nanoparticles for electrochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released by cells at the nanomolar level. *Analytical Chemistry*, 85(21):10289–10295, 2013.
- [99] C C Kuo, W J Lan, and C H Chen. Redox preparation of mixed-valence cobalt manganese oxide nanostructured materials: highly efficient noble metal-free electrocatalysts for sensing hydrogen peroxide. *Nanoscale*, 6(1):334–341, 2014.
- [100] S J He, B Y Zhang, M M Liu, and W Chen. Non-enzymatic hydrogen peroxide electrochemical sensor based on a three-dimensional MnO<sub>2</sub> nanosheets/carbon foam composite. *Rsc Advances*, 4(90):49315–49323, 2014.

- [101] Xiaoyun Lin, Yongnian Ni, and Serge Kokot. Electrochemical and bio-sensing platform based on a novel 3D Cu nano-flowers/layered MoS<sub>2</sub> composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 79:685–692, 2016.
- [102] Jiyong Huang, Kai Wang, and Zhixiang Wei. Conducting polymernanowire arrays with enhanced electrochemical performance. *J. Mater. Chem.*, 20(6):1117–1121, 2010.
- [103] Alexander Zöpfl, Masoumeh Sisakthi, Jonathan Eroms, Frank-Michael Matysik, Christoph Strunk, and Thomas Hirsch. Signal enhancement in amperometric peroxide detection by using graphene materials with low number of defects. *Microchimica Acta*, 183(1):83–90, 2016.
- [104] Kuo Chiang Lin, Tsung Hsuan Tsai, and Shen Ming Chen. Performing enzyme-free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor and simultaneous determination for AA, DA, and UA by MWCNT-PEDOT film. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2):608–614, 2010.
- [105] Prakasam Gayathri and Annamalai Senthil Kumar. An iron impurity in multiwalled carbon nanotube complexes with chitosan that biomimics the heme-peroxidase function. *Chemistry - A European Journal*, 19(50):17103–17112, 2013.
- [106] Changsheng Shan, Lingnan Wang, Dongxue Han, Fenghua Li, Qixian Zhang, Xindong Zhang, and Li Niu. Polyethyleneimine-functionalized graphene and its layer-by-layer assembly with Prussian blue. *Thin Solid Films*, 534:572–576, 2013.
- [107] Renato S. Freire, Christiana A. Pessoa, Lucilene D. Mello, and Lauro T. Kubota. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2):230–243, 2003.
- [108] Tautgirdas Ruzgas, Elisabeth Csöregi, Jenny Emnéus, Lo Gorton, and György Markovarga. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta*, 330(2-3):123–138, 1996.
- [109] Periasamy Arun Prakash, Umasankar Yogeswaran, and Shen Ming Chen. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. *Sensors*, 9(3):1821–1844, 2009.
- [110] Rong Huang and Naifei Hu. Direct electrochemistry and electrocatalysis with horseradish peroxidase in Eastman AQ films. *Bioelectrochemistry*, 54(1):75–81, 2001.
- [111] Rui Yan, Faqiong Zhao, Jiangwen Li, Fei Xiao, Shuangshuang Fan, and Baizhao Zeng. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase in gelatin-hydrophobic ionic liquid gel films. *Electrochimica Acta*, 52(26):7425–7431, 2007.
- [112] Yuanyuan Yao, Yangping Wen, Long Zhang, Jingkun Xu, Zifei Wang, and Xuemin Duan. A stable sandwich-type hydrogen peroxide sensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a silver nanoparticle monolayer supported by PEDOT:PSS-nafion composite electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(7):9348–9359, 2013.

- [113] Chunmei Yu, Yidan Wang, Li Wang, Zhengkun Zhu, Ning Bao, and Haiying Gu. Nanos-structured biosensors built with layer-by-layer electrostatic assembly of hemoglobin and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pt nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:231–237, 2013.
- [114] Masoud Negahdary, Asadollah Asadi, Shokoufeh Mehrdashfar, Mojtaba Imandar, Hajar Akbari-Dastjerdi, Fatemeh Salahi, Azar Jamaledini, and Marziyeh Ajdary. A biosensor for determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by use of HRP enzyme and modified CPE with ZnO Nps. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(6):5185–5194, 2012.
- [115] Miao Qing Xu, Jian Feng Wu, and Guang Chao Zhao. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on myoglobin immobilized on SDS-GNPs-GR modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(5):6502–6512, 2013.
- [116] Seetharamaiah Nandini, Seetharamaiah Nalini, Pathappa Niranjana, Jose Savio Melo, and Gurukar Shivappa Suresh. Metal-ion co-ordination assembly based multilayer of one dimensional gold nanostructures and catalase as electrochemical sensor for the analysis of hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 245:726–740, 2017.
- [117] A. K M Kafi, Asieh Ahmadalinezhad, Jingpeng Wang, Dan F. Thomas, and Aicheng Chen. Direct growth of nanoporous Au and its application in electrochemical biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(11):2458–2463, 2010.
- [118] Wei Wang, Tai Ji Zhang, De Wen Zhang, Hong Yi Li, Yu Rong Ma, Li Min Qi, Ying Lin Zhou, and Xin Xiang Zhang. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of heme proteins on gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite. *Talanta*, 84(1):71–77, 2011.
- [119] Gan Yang, Ruo Yuan, and Ya Q. Chai. A high-sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on gold colloid/l-cysteine/gold colloid/nanoparticles Pt-chitosan composite film-modified platinum disk electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(1):93–100, 2008.
- [120] Ali Shokuhi Rad, Mohsen Jahanshahi, Mehdi Ardjmand, and Ali Akbar Safekordi. Hydrogen peroxide biosensor based on enzymatic modification of electrode using deposited silver nano layer. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(3):2623–2632, 2012.
- [121] Hongxia Dai, Wenjuan Lü, Xianwei Zuo, Qian Zhu, Congjie Pan, Xiaoying Niu, Juanjuan Liu, Hong Li Chen, and Xingguo Chen. A novel biosensor based on boronic acid functionalized metal-organic frameworks for the determination of hydrogen peroxide released from living cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 95(January):131–137, 2017.
- [122] Fengxian Gao, Ruo Yuan, Yaqin Chai, Mingyu Tang, Shurui Cao, and Shihong Chen. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of Hb on gold nanoparticles/cysteine/poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified platinum disk electrode. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 295(1-3):223–227, 2007.

- [123] A. K M Kafi, Guosheng Wu, and Aicheng Chen. A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4):566–571, 2008.
- [124] Hai Wu, Xiuyan Wang, Mengxia Qiao, Hong Zhang, Xiaoyan Jin, and Suhua Fan. Enhancing sensitivity of hemoglobin-based electrochemical biosensor by using protein conformational intermediate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 221:694–699, 2015.
- [125] Yanju Wu, Fei Wang, Kui Lu, Mingxiu Lv, and Yufen Zhao. Self-assembled dipeptide-graphene nanostructures onto an electrode surface for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 244:1022–1030, 2017.
- [126] Leili Aghebati-maleki, Bahareh Salehi, Rezvan Behfar, Hajar Saeidmanesh, Fereshte Ahmadian, Mohammadtaghi Sarebanhassanabadi, and Masoud Negahdary. Designing a hydrogen peroxide biosensor using catalase and modified electrode with magnesium oxide nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 9:257–271, 2014.
- [127] Yaping He, Qinglin Sheng, Jianbin Zheng, Minzhi Wang, and Bin Liu. Magnetite-graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing application. *Electrochimica Acta*, 56(5):2471–2476, 2011.
- [128] A. T Ezhil Vilian, Shen Ming Chen, Cheol Hwan Kwak, Seung Kyu Hwang, Yun Suk Huh, and Young Kyu Han. Immobilization of hemoglobin on functionalized multi-walled carbon nanotubes-poly-l-histidine-zinc oxide nanocomposites toward the detection of bromate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 224:607–617, 2015.
- [129] Shanmugasundaram Komathi, Anantha Iyengar Gopalan, Soo Kyung Kim, Gopalan Sai Anand, and Kwang Pill Lee. Fabrication of horseradish peroxidase immobilized poly(N-[3-(trimethoxy silyl)propyl]aniline) gold nanorods film modified electrode and electrochemical hydrogen peroxide sensing. *Electrochimica Acta*, 92:71–78, 2013.
- [130] Hai Li Zhang, Xiao Zhi Zou, Guo Song Lai, De Yan Han, and Fang Wang. Direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on carbon-coated iron nanoparticles for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Electroanalysis*, 19(18):1869–1874, 2007.
- [131] Ting Wang, Lu Wang, Jiaojiao Tu, Huayu Xiong, and Shengfu Wang. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilised in carbon-coated nickel magnetic nanoparticle-chitosan-dimethylformamide composite films in room-temperature ionic liquids. *Bioelectrochemistry*, 94:94–99, 2013.
- [132] Ajay Kumar Yagati, Taek Lee, Junhong Min, and Jeong Woo Choi. An enzymatic biosensor for hydrogen peroxide based on CeO<sub>2</sub> nanostructure electrodeposited on ITO surface. *Biosensors and Bioelectronics*, 47:385–390, 2013.
- [133] H. Wang, Y. Liu, M. Li, H. Huang, Hong Mei Xu, Rui Jiang Hong, and H. Shen. Multifunctional TiO<sub>2</sub> nanowires-modified nanoparticles bilayer film for 3D dye-sensitized solar cells. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications*, 4(8):1166–1169, 2010.



- [134] Abd Elgawad Radi, Xavier Muñoz-Berbel, Montserrat Cortina-Puig, and Jean Louis Marty. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase covalently immobilized on electrografted organic film on screen-printed carbon electrode. *Electroanalysis*, 21(14):1624–1629, 2009.
- [135] Xiaoqiang Liu, Heqing Feng, Ruoxia Zhao, Yanbing Wang, and Xiuhua Liu. A novel approach to construct a horseradish peroxidase | hydrophilic ionic liquids | Au nanoparticles dotted titanate nanotubes biosensor for amperometric sensing of hydrogen peroxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1):101–104, 2012.
- [136] Anantha Iyengar Gopalan, Shanmugasundaram Komathi, Gopalan Sai Anand, and Kwang Pill Lee. Nanodiamond based sponges with entrapped enzyme: A novel electrochemical probe for hydrogen peroxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 46(March 2013):136–141, 2013.
- [137] Shiyi Xu and Xiaozu Han. A novel method to construct a third-generation biosensor: Self-assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(9):1117–1120, 2004.
- [138] Chunbo Ren, Yonghai Song, Zhuang Li, and Guoyi Zhu. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on a silver nanoparticles/cysteamine/gold electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(6):1179–1185, 2005.
- [139] Xianbo Lu, Zhenhai Wen, and Jinghong Li. Hydroxyl-containing antimony oxide bromide nanorods combined with chitosan for biosensors. *Biomaterials*, 27(33):5740–5747, 2006.
- [140] Jianwen Wang, Ming Gu, Junwei Di, Yansheng Gao, Ying Wu, and Yifeng Tu. A carbon nanotube/silica sol-gel architecture for immobilization of horseradish peroxidase for electrochemical biosensor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(4):289–296, 2007.
- [141] Mohammed ElKaoutit, Ignacio Naranjo-Rodríguez, Manuel Domínguez, Maria P. Hernández-Artiga, Dolores Bellido-Milla, and José Luis Hidalgo-Hidalgo de Cisneros. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion-Sonogel-Carbon composite. *Electrochimica Acta*, 53(24):7131–7137, 2008.
- [142] Fanghua Wu, Zhichao Hu, Jingjing Xu, Yuan Tian, Liwei Wang, Yuezhong Xian, and Litong Jin. Immobilization of horseradish peroxidase on self-assembled (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane film: Characterization, direct electrochemistry, redox thermodynamics and biosensing. *Electrochimica Acta*, 53(28):8238–8244.
- [143] MF Clark, RM Lister, and M Bar-Joseph. ELISA Techniques. *Methods in Enzymology*, 118(1971):742–766, 1986.
- [144] Luis Asensio, Isabel González, Teresa García, and Rosario Martín. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1):1–8, 2008.

- [145] M. A. Rocha-Peña, R. F. Lee, and C. L. Niblett. Development of a dot-immunobinding assay for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods*, 34(3):297–309, 1991.
- [146] Shi Jin and Robert T. Kennedy. New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters*, 26(4):416–418, 2015.
- [147] Xia Feng, Jibao Wang, Zhiyun Gao, Yu Tian, Ling Zhang, Huichao Chen, Tong Zhang, Lin Xiao, Jun Yao, Wenge Xing, Maofeng Qiu, and Yan Jiang. An alternative strategy to western blot as a confirmatory diagnostic test for HIV infection. *Journal of Clinical Virology*, 88:8–11, 2017.
- [148] Veeradasan Perumal and Uda Hashim. ScienceDirect Advances in biosensors : Principle , architecture and. *Journal of Economics, Finance and Administrative Science*, 12(1):1–15, 2013.
- [149] Xiang Zhu, Xiangheng Niu, Hongli Zhao, and Minbo Lan. Doping ionic liquid into Prussian blue-multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed electrode to enhance the nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing performance. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 195:274–280, 2014.
- [150] Raquel B Queirós, J P Noronha, P V S Marques, and M G F Sales. Label-free Detection of Microcystin-LR in Waters Using Real- Time Potentiometric Biosensors Based on Single-Walled Carbon Nanotubes Imprinted Polymers. *Procedia Engineering*, 47:758–761, 2012.
- [151] Jeffrey T Mabeck and Æ George G Malliaras. Chemical and biological sensors based on organic thin-film transistors. pages 343–353, 2006.
- [152] Mamas I. Prodromidis. Impedimetric immunosensors-A review. *Electrochimica Acta*, 55(14):4227–4233, 2010.
- [153] Q L Ouyang, S W Zeng, X Q Dinh, P Coquet, and K T Yong. Sensitivity Enhancement of MoS<sub>2</sub> Nanosheet based Surface Plasmon Resonance Biosensor. *International Conference on Materials for Advanced Technologies*, 140:134–139, 2016.
- [154] Maria Laura Ermini, Stefano Mariani, Simona Scarano, and Maria Minunni. Bioanalytical approaches for the detection of single nucleotide polymorphisms by Surface Plasmon Resonance biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 61:28–37, 2014.
- [155] Jie Cao, Tong Sun, and Kenneth T V Grattan. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 195:332–351, 2014.
- [156] Aldo Roda, Mara Mirasoli, Elisa Michelini, Massimo Di Fusco, Martina Zangheri, Luca Cevenini, Barbara Roda, and Patrizia Simoni. Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review. *Biosensors and Bioelectronics*, 76:164–179, 2016.
- [157] Hiroshi Ueda and Jinhua Dong. From fluorescence polarization to Quenchbody: Recent progress in fluorescent reagentless biosensors based on antibody and other binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(11):1951–1959, 2014.

- [158] Petr Skládal. Piezoelectric biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79:127–133, 2016.
- [159] Zhiwei Zhao, Wei Lei, Xiaobing Zhang, Baoping Wang, and Helong Jiang. ZnO-based amperometric enzyme biosensors. *Sensors*, 10(2):1216–1231, 2010.
- [160] Sevinc Kurbanoglu, Sibel A. Ozkan, and Arben Merkoçi. Nanomaterials-Based Enzyme Electrochemical Biosensors Operating Through Inhibition for Biosensing Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, (September):1–13, 2016.
- [161] Kobra Omidfar, Fahimeh Khorsand, and Maedeh Darziani Azizi. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 43(1):336–347, 2013.
- [162] F Davis and S P J Higson. *6 - Biosensors for {DNA} and {RNA} detection and characterization*. Elsevier Masson SAS., 2012.
- [163] Jiani Zhang, Bo Liu, Huixia Liu, Xiaobing Zhang, and Weihong Tan. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine*, 8(6):983–93, 2013.
- [164] K Farrokhzad, C Rosenfield, and B Applegate. *4 - Phage technology in high throughput screening for pathogen detection in food*. Elsevier Ltd., 2015.
- [165] Mary a Arugula and Aleksandr Simonian. Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives. *Measurement Science and Technology*, 25(3):032001, 2014.
- [166] Min Sun, Bin Ding, Jinyou Lin, Jianyong Yu, and Gang Sun. Three-dimensional sensing membrane functionalized quartz crystal microbalance biosensor for chloramphenicol detection in real time. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 160(1):428–434, 2011.
- [167] Simona Scarano, Marco Mascini, Anthony P F Turner, and Maria Minunni. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5):957–966, 2010.
- [168] Miriam M. Ngundi, Chris R. Taitt, and Frances S. Ligler. Simultaneous determination of kinetic parameters for the binding of cholera toxin to immobilized sialic acid and monoclonal antibody using an array biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(1):124–130, 2006.
- [169] Jiehua Lin and Huangxian Ju. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8 SPEC. ISS.):1461–1470, 2005.
- [170] Robert Huber. Antibody structure. *Trends in Biochemical Sciences*, 1(8):174 – 178, 1976.
- [171] Carl Koch. Chapter 6 Bulk Behavior of Nanostructured Materials. *Nanostructured Materials*, pages 93–112, 1983.
- [172] Philip Moriarty. Nanostructured Materials. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, 64(3):297–381, 2001.

- [173] R a Andrievski. Size-dependent effects in properties of nanostructured materials. *Rev. Adv. Mater. Sci*0, 21:107–133, 2009.
- [174] Liang Ding, Alan M. Bond, Jianping Zhai, and Jie Zhang. Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 797:1–12, 2013.
- [175] Pooria Namdari, Babak Negahdari, and Ali Eatemadi. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87(88):209–222, 2017.
- [176] Somenath Roy and Zhiqiang Gao. Nanostructure-based electrical biosensors. *Nano Today*, 4(4):318–334, 2009.
- [177] Fahad S. Al-Mubaddel, Sajjad Haider, Waheed A. Al-Masry, Yousef Al-Zeghayer, Muhammad Imran, Adnan Haider, and Zahoor Ullah. Engineered nanostructures: A review of their synthesis, characterization and toxic hazard considerations. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012.
- [178] Nicha Chartuprayoon, Miluo Zhang, Wayne Bosze, Yong Ho Choa, and Nosang V. Myung. One-dimensional nanostructures based bio-detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 63:432–443, 2015.
- [179] Jieon Lee, Jung-ho Kim, Seongchan Kim, and Dal-Hee Min. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application. *Advanced drug delivery reviews*, 105:1–13, 2016.
- [180] Sahar Saleem Bhat, Ahsanulhaq Qurashi, and Firdous Ahmad Khanday. ZnO nanostructures based biosensors for cancer and infectious disease applications: Perspectives, prospects and promises. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 86:1–13, 2017.
- [181] Tapan Sarkar, Yingning Gao, and Ashok Mulchandani. Carbon nanotubes-based label-free affinity sensors for environmental monitoring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(5):1011–1025, 2013.
- [182] Dawid Nidzworski, Paulina Pranszke, Magda Grudniewska, Ewelina Król, and Beata Gromadzka. Universal biosensor for detection of influenza virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 59:239–242, 2014.
- [183] R. Sharma, S. E. Deacon, D. Nowak, S. E. George, M. P. Szymonik, A. A S Tang, D. C. Tomlinson, A. G. Davies, M. J. McPherson, and C. Wälti. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 80:607–613, 2016.
- [184] Jafar Ezzati Nazhad Dolatabadi and Miguel de la Guardia. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors as advanced diagnostic tools. *Analytical Methods*, 6(12):3891, 2014.
- [185] Parikha Mehrotra. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2):153–159, 2016.

- [186] Mohga Khater, Alfredo de la Escosura-Muñiz, and Arben Merkoçi. Biosensors for plant pathogen detection. *Biosensors & bioelectronics*, (September):1–15, 2016.
- [187] Louis X. Tiefenauer, Sebastian Kossek, Celestino Padeste, and Pierre Thiébaud. Towards amperometric immunosensor devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(3):213–223, 1997.
- [188] Guiwan Koh, Shuchi Agarwal, Pui Sze Cheow, and Chee Seng Toh. Development of a membrane-based electrochemical immunosensor. *Electrochimica Acta*, 53(2):803–810, 2007.
- [189] Ying Zhuo, Pei X. Yuan, Ruo Yuan, Ya Q. Chai, and Cheng L. Hong. Nanostructured conductive material containing ferrocenyl for reagentless amperometric immunosensors. *Biomaterials*, 29(10):1501–1508, 2008.
- [190] Shihong Chen, Ruo Yuan, Yaqin Chai, Yang Xu, Ligen Min, and Na Li. A new antibody immobilization technique based on organic polymers protected Prussian blue nanoparticles and gold colloidal nanoparticles for amperometric immunosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 135(1):236–244, 2008.
- [191] Jiadong Huang, Qing Lin, Xiuming Zhang, Xiaorui He, Xianrong Xing, Wenjing Lian, Mingming Zuo, and Qingqing Zhang. Electrochemical immunosensor based on polyaniline/poly (acrylic acid) and Au-hybrid graphene nanocomposite for sensitivity enhanced detection of salbutamol. *Food Research International*, 44(1):92–97, 2011.
- [192] Shuai Zang, Yingju Liu, Mouhong Lin, Jianli Kang, Yuanming Sun, and Hongtao Lei. A dual amplified electrochemical immunosensor for ofloxacin: Polypyrrole film-Au nanocluster as the matrix and multi-enzyme-antibody functionalized gold nanorod as the label. *Electrochimica Acta*, 90:246–253, 2013.
- [193] Kai Chen, Zhengkun Lu, Yingqiang Qin, and Guifen Jie. A novel PAMAM-Au nanostructure-amplified CdSe quantum dots electrochemiluminescence for ultrasensitive immunoassay. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 754:160–164, 2015.
- [194] Praveen Guleria Vineet Kumar , Avnesh Kumari and and Sudesh Kumar Yadav. Evaluating the Toxicity of Selected Types of Nanochemicals. In David M. Whitacre, editor, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, volume 215, pages 39–121. Springer New York, 2012.
- [195] Maria Ada Malvindi, Virgilio Brunetti, Giuseppe Vecchio, Antonio Galeone, Roberto Cingolani, and Pier Paolo Pompa. SiO<sub>2</sub> nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale*, 4:486–495, 2012.
- [196] Eleonore Fröhlich. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7:5577–5591, 2012.
- [197] Tarek Baati, Ahmed Al-Kattan, Marie-anne Esteve, Leila Njim, Yury Ryabchikov, Florence Chaspoul, Mohamed Hammami, Marc Sentis, Andrei V Kabashin, and Diane Braguer. Ultrapure laser-synthesized Si-based nanomaterials for biomedical applications: in vivo assessment of safety and biodistribution. *Scientific Reports*, 6(April):25400, 2016.

- [198] D. Tang, J. C. Saucedo, Z. Lin, S. Ott, E. Basova, I. Goryacheva, S. Biselli, J. Lin, R. Niessner, and D. Knopp. Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2):514–518, 2009.
- [199] Isaac Koh and Lee Josephson. Magnetic Nanoparticle Sensors. *Sensors*, 9(10):8130–8145, 2009.
- [200] Ji Lai Gong, Yi Liang, Yong Huang, Ji Wei Chen, Jian Hui Jiang, Guo Li Shen, and Ru Qin Yu. Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7):1501–1507, 2007.
- [201] R. Viter, V. Smyntyna, N. Starodub, A. Tereshchenko, A. Kusevitch, I. Doychoa, S. Geveluk, N. Slishik, J. Buk, J. Duchoslav, J. Lubchuk, I. Konup, A. Ubelis, and J. Spigulis. Novel immune TiO<sub>2</sub> photoluminescence biosensors for leucosis detection. *Procedia Engineering*, 47:338–341, 2012.
- [202] Y C Yang, S W Dong, T Shen, C X Jian, H J Chang, Y Li, F T He, and J X Zhou. A Label-Free Amperometric Immunoassay for Thrombomodulin Using Graphene/Silver-Silver Oxide Nanoparticles as a Immobilization Matrix. *Analytical Letters*, 45(7):724–734, 2012.
- [203] Bo Tian, Zhen Qiu, Jing Ma, Teresa Zardán Gómez de la Torre, Christer Johansson, Peter Svedlindh, and Mattias Strömberg. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016.
- [204] P. Sanguino, Tiago Monteiro, S. R. Bhattacharyya, C. J. Dias, Rui Igreja, and Ricardo Franco. ZnO nanorods as immobilization layers for interdigitated capacitive immunosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 204:211–217, 2014.
- [205] Anees A. Ansari, Ajeet Kaushik, Pratima R. Solanki, and B. D. Malhotra. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. *Bioelectrochemistry*, 77(2):75–81, 2010.
- [206] Rujuta D. Munje, Michael Jacobs, Sriram Muthukumar, Bilal Quadri, Nandhinee Radha Shanmugam, and Shalini Prasad. Novel approach for electrical tuning of nano-textured zinc oxide surfaces for ultra-sensitive troponin-T detection. *Anal. Methods*, 7(24):10136–10144, 2015.
- [207] Zhiwei Zhao, Wei Lei, Xiaobing Zhang, Baoping Wang, and Helong Jiang. ZnO-based amperometric enzyme biosensors. *Sensors*, 10(2):1216–1231, 2010.
- [208] Jin-hua Li, Jing Li, Xuan Fang, Xiao-Hua Wang, and Zhi-Peng Wei. Fabrication and Characteristic of ZnO Glucose Oxidase Enzyme Electrode Based on Flexible Substrate, 2012.
- [209] Bernard Munge, Guodong Liu, Greg Collins, and Joseph Wang. Multiple enzyme layers on carbon nanotubes for electrochemical detection down to 80 DNA copies. *Analytical Chemistry*, 77(14):4662–4666, 2005.

- [210] Jingquan Liu, Alison Chou, Wibowo Rahmat, Michael N. Paddon-Row, and J. Justin Gooding. Achieving direct electrical connection to glucose oxidase using aligned single walled carbon nanotube arrays. *Electroanalysis*, 17(1):38–46, 2005.
- [211] Song Qin Liu and Huang Xian Ju. Renewable reagentless hydrogen peroxide sensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold-modified electrode. *Analytical Biochemistry*, 307(1):110–116, 2002.
- [212] Haipeng Yang and Yongfa Zhu. Size dependence of SiO<sub>2</sub> particles enhanced glucose biosensor. *Talanta*, 68(3):569–574, 2006.
- [213] Alain Walcarius, Shelley D. Minteer, Joseph Wang, Yuehe Lin, and Arben Merkoçi. Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(38):4878, 2013.
- [214] Aliakbar Tarlani, Mahtab Fallah, Behzad Lotfi, Avidah Khazraei, Sommayeh Golsanamlou, Jacques Muzart, and Maryam Mirza-Aghayan. New ZnO nanostructures as non-enzymatic glucose biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 67:601–607, 2015.
- [215] Detlef W Bahnemann, Claudius Kormann, and Michael R Hoffmann. Preparation and characterization of quantum size zinc oxide: a detailed spectroscopic study. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(14):3789–3798, 1987.
- [216] Claudia Sandoval, Oscar Marin, Silvina Real, David Comedi, and Mónica Tirado. Electrophoretic deposition of ZnO nanostructures: Au nanoclusters on Si substrates induce self-assembled nanowire growth. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 187:21–25, 2014.
- [217] Carmen C. Mayorga Martinez, Ernesto F. Treo, Rossana E. Madrid, and Carmelo C. Felice. Evaluation of chrono-impedance technique as transduction method for a carbon paste/glucose oxidase (CP/GOx) based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4):1239–1244, 2010.
- [218] Carmen C Mayorga Martinez, Rossana E Madrid, and Carmelo J Felice. Biosensor de Glucosa Basado en Electrodo de Acero Inoxidable Electrodepositado con óxido de Iridio y Glucosa Oxidasa. (2):218–222, 2011.
- [219] Luciano D. Sappia, Matias R. Trujillo, Israel Lorite, Rossana E. Madrid, Monica Tirado, David Comedi, and Pablo Esquinazi. Nanostructured ZnO films: A study of molecular influence on transport properties by impedance spectroscopy. *Materials Science and Engineering: B*, 200:124–131, 2015.
- [220] Kajal Jindal, Monika Tomar, and Vinay Gupta. Inducing electrocatalytic functionality in ZnO thin film by N doping to realize a third generation uric acid biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 55:57–65, 2014.
- [221] P. Mitra, A.P. Chatterjee, and H.S. Maiti. ZnO thin film sensor. *Materials Letters*, 35(1-2):33–38, 1998.

- [222] Sumati Pati, a Maity, P Banerji, and S B Majumder. Qualitative and quantitative differentiation of gases using ZnO thin film gas sensors and pattern recognition analysis. *The Analyst*, 139(7):1796–800, 2014.
- [223] I. Lorite, J. Wasik, T. Michalsky, R. Schmidt-Grund, and P. Esquinazi. Hydrogen influence on the electrical and optical properties of ZnO thin films grown under different atmospheres. *Thin Solid Films*, 556:18–22, 2014.
- [224] Chongmu Lee, Yeonkyu Park, and Kyungha Kim. Effects of the Crystallographic Orientation of the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Substrate on the Structural and the Optical Properties of ZnO Thin Films. *Journal of the Korean Physical Society*, 48(6):1570–1573, 2006.
- [225] A. Poghossian, A. Cherstvy, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, and M. J. Schöning. Possibilities and limitations of label-free detection of DNA hybridization with field-effect-based devices. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 111-112(SUPPL.):470–480, 2005.
- [226] Anna Cattani-Scholz, Daniel Pedone, Manish Dubey, Stefan Nepl, Bert Nickel, Peter Feulner, Jeffrey Schwartz, Gerhard Absteiter, and Marc Tornow. Organophosphonate-based PNA-functionalization of silicon nanowires for label-free DNA detection. *ACS Nano*, 2(8):1653–1660, 2008.
- [227] J. Justin J Gooding and D. Brynn B Hibbert. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *TRAC-Trends Anal. Chem.*, 18(8):525–533, 1999.
- [228] Nirmalya K. Chaki and K. Vijayamohan. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1-2):1–12, 2002.
- [229] Elisabeth Briand, Michèle Salmain, Chantal Compère, and Claire Marie Pradier. Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2):215–224, 2006.
- [230] Shadpour Mallakpour and Maryam Madani. A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, 86:194–207, 2015.
- [231] Marie-Alexandra Neouze and Ulrich Schubert. Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands. *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly*, 139(3):183–195, 2008.
- [232] Anna Cattani-scholz. Functional Organophosphonate Interfaces for Nanotechnology : A Review. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, (9):25643–25655, 2017.
- [233] P. Hubert Mutin, Gilles Guerrero, and André Vioux. Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36):3761, 2005.
- [234] T. Wei, C. Q. Jin, W. Zhong, and J. M. Liu. High permittivity polymer embedded with CoZnO core/shell nanoparticles modified by organophosphorus acid. *Applied Physics Letters*, 91(22):1–4, 2007.



- [235] Peter J Hotchkiss, Michal Malicki, Anthony J Giordano, Neal R Armstrong, and Seth R Marder. Characterization of phosphonic acid binding to zinc oxide. *Journal of Materials Chemistry*, 21(9):3107–3112, 2011.
- [236] Souvik Pal, Manoj Kumar Sharma, Bengt Danielsson, Magnus Willander, Ratnamala Chatterjee, and Sunil Bhand. A miniaturized nanobiosensor for choline analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 54:558–564, 2014.
- [237] Wei Wei Zhao, Jing Juan Xu, and Hong Yuan Chen. Photoelectrochemical aptasensing. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82:307–315, 2016.
- [238] Hedieh Haji-Hashemi, Parviz Norouzi, Mohammad Reza Safarnejad, and Mohammad Reza Ganjali. Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244:211–216, 2017.
- [239] Donghai Lin, Thompson Tang, D. Jed Harrison, William E. Lee, and Abebaw B. Jemere. A regenerating ultrasensitive electrochemical impedance immunosensor for the detection of adenovirus. *Biosensors and Bioelectronics*, 68:129–134, 2015.
- [240] S. Suye, T. Matsuura, T. Kimura, H. Zheng, T. Hori, Y. Amano, and H. Katayama. Amperometric DNA sensor using gold electrode modified with polymerized mediator by layer-by-layer adsorption. *Microelectronic Engineering*, 81(2-4):441–447, 2005.
- [241] Jian Weng, Jianfeng Zhang, Hui Li, Liping Sun, Chenghong Lin, and Qiqing Zhang. Label-free DNA sensor by boron-doped diamond electrode using an ac impedimetric approach. *Analytical Chemistry*, 80(18):7075–7083, 2008.
- [242] Xiangyang Zhang, Youming Shen, Youyu Zhang, Guangyu Shen, Haiyan Xiang, and Xiaofeng Long. A label-free electrochemical immunosensor based on a new polymer containing aldehyde and ferrocene groups. *Talanta*, 164(November 2016):483–489, 2017.
- [243] Saeid Kakooei, Mokhtar Che Ismail, and Bambang Ari Wahjoedi. Electrochemical Study of Iridium Oxide Coating on Stainless Steel Substrate. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8:3290–3301, 2013.
- [244] Carmen C. Mayorga Martinez, Rossana E. Madrid, and Carmelo J. Felice. Electrochemical and geometrical characterization of iridium oxide electrodes in stainless steel substrate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 133(2):682–686, 2008.
- [245] Ulrich Siemeling, Stefan Rittinghaus, Tobias Weidner, Jeremy Brison, and David Castner. COOH-terminated SAMs on gold fabricated from an azobenzene derivative with a 1,2-dithiolane headgroup. *Applied Surface Science*, 256(6):1832–1836, 2010.
- [246] Anna Cattani-scholz, Daniel Pedone, Manish Dubey, Stefan Neppel, Bert Nickel, K Peter Feulner, Jeffrey Schwartz, Gerhard Abstreiter, and Marc Tornow. Organophosphonate-Based PNA-Functionalization of Silicon Nanowires for Label-Free DNA Detection. *2(8):1653–1660*, 2008.

- [247] Irmgard Wenzl, Chi Ming Yam, David Barriet, and T. Randall Lee. Structure and Wettability of Methoxy-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir*, 19(24):10217–10224, 2003.
- [248] Rosalynn Quiñones, Kate Rodriguez, and Robbie J. Iuliucci. Investigation of phosphonic acid surface modifications on zinc oxide nanoparticles under ambient conditions. *Thin Solid Films*, 565:155–164, 2014.
- [249] Manuel Antuch, Darío G. Abradelo, and Roberto Cao. Intermolecular interactions in mixed self-assembled monolayers of ferrocene. *Electroanalysis*, pages 1939–1943, 2015.
- [250] Reza Karimi Shervedani, Abdolhamid Hatefi Mehrjardi, and Najmehsadat Zamiri. A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2):201–208, 2006.
- [251] Meng Shan Lin and Bor Zuan Jan. Determination of Hydrogen Peroxide by Utilizing a Glassy Carbon Electrode as a Chemical Sensor. 6:340–344, 1997.
- [252] Jiao Yang, Meng Lin, MiSuk S. Cho, and Youngkwan Lee. Determination of hydrogen peroxide using a Prussian Blue modified macroporous gold electrode. *Microchimica Acta*, 182(5-6):1089–1094, 2015.
- [253] Mohammadre Shokouhimehr. Prussian Blue Nanoparticles and its Analogues as New-Generation T1-Weighted MRI Contrast Agents for Cellular Imaging. pages 1–93, 2010.
- [254] Martin Lucas Zamora, Gabriel Alfredo Ruiz, and Carmelo Jose Felice. Evaluation of sugar yeast consumption by measuring electrical medium resistance. *Journal of Electrical Bioimpedance*, 4(1):51–56, 2013.
- [255] Kakooei Saeid, Ismaila Mokhtar Che, and Ari-wahjoedia Bambang. Electrodeposition of Iridium Oxide by Cyclic Voltammetry : Application of Response Surface Methodology Electrodeposition of Iridium Oxide by Cyclic Voltammetry :. 04024(June), 2016.
- [256] Qian Zhang, Ling Zhang, and Jinghong Li. "Green" synthesis of size controllable Prussian blue nanoparticles stabilized by soluble starch. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(12):4557–4561, 2007.
- [257] Carmen C. Mayorga Martinez, Rossana E. Madrid, and Carmelo J. Felice. Electrochemical and geometrical characterization of iridium oxide electrodes in stainless steel substrate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 133(2):682–686, 2008.
- [258] Carmen C Mayorga Martinez, Rossana E. Madrid, and Carmelo J. Felice. A pH sensor based on a stainless steel electrode electrodeposited with iridium oxide. *IEEE Transactions on Education*, 52(1):133–136, 2009.
- [259] Jun-Yu Hu, Yu-Ping Lin, and Ying-Chih Liao. Inkjet printed Prussian blue films for hydrogen peroxide detection. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 28(2):135–40, 2012.

- [260] Behzad Haghighi, Hassan Hamidi, and Lo Gorton. Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 147(1):270–276, 2010.
- [261] Jinchun Li, Yuzhou Jiang, Yunyun Zhai, Haiqing Liu, and Lei Li. Prussian Blue/Reduced Graphene Oxide Composite for the Amperometric Determination of Dopamine and Hydrogen Peroxide. *Analytical Letters*, 48(17):2786–2798, 2015.
- [262] Jiao Yang, Meng Lin, Misuk Cho, and Youngkwan Lee. Determination of hydrogen peroxide using a Prussian Blue modified macroporous gold electrode. pages 0–5, 2014.
- [263] Anthony Guiseppi-Elie, Sean Brahim, Gymama Slaughter, and Kevin R. Ward. Design of a subcutaneous implantable biochip for monitoring of glucose and lactate. *IEEE Sensors Journal*, 5(3):345–355, 2005.
- [264] Scherrine A. Tria, David Lopez-Ferber, Catherine Gonzalez, Ingrid Bazin, and Anthony Guiseppi-Elie. Microfabricated biosensor for the simultaneous amperometric and luminescence detection and monitoring of Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 79:835–842, 2016.
- [265] Md Mahbubur Rahman, A. J Saleh Ahammad, Joon Hyung Jin, Sang Jung Ahn, and Jae Joon Lee. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 10(5):4855–4886, 2010.
- [266] Gusphyl Justin, Stephen Finley, Abdur Rub Abdur Rahman, and Anthony Guiseppi-Elie. Biomimetic hydrogels for biosensor implant biocompatibility: Electrochemical characterization using micro-disc electrode arrays (MDEAs). *Biomedical Microdevices*, 11(1):103–115, 2009.
- [267] Allen J Bard and Larry R Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc, second edition, 2001.
- [268] Christian N. Kotanen, Francis Gabriel Moussy, Sandro Carrara, and Anthony Guiseppi-Elie. Implantable enzyme amperometric biosensors, 2012.
- [269] Christian Kotanen and Anthony Guiseppi-Elie. Wireless System with Multianalyte Implantable Biotransducer. In Wayne Bureson and Sandro Carrara, editors, *Security and Privacy for Implantable Medical Devices*, pages 83–91. Springer New York, New York, NY, 2014.
- [270] A. A. Karyakin and E. E. Karyakina. Electroanalytical applications of Prussian Blue and its analogs. *Russian Chemical Bulletin*, 50(10):1811–1817, 2001.
- [271] Damir Iveković, Hana Vlašić Trbić, Robert Peter, Mladen Petravić, Miran Čeh, and Boris Pihlar. Enhancement of stability of Prussian blue thin films by electrochemical insertion of Ni<sup>2+</sup> ions: A stable electrocatalytic sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mild alkaline media. *Electrochimica Acta*, 78:452–458, 2012.

- [272] Publisher Taylor, Karl Herrmann, Charles W Nagel, and Karl Herrmann. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods*. Number July 2012. 2009.
- [273] A. Escarpa and M. C. Gonzalez. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2):57–139, 2001.
- [274] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliker, and O. I. Aruoma. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7):601–617, 1995.
- [275] Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possibles modes of action. *Journal of Natural Products*, 59:205–215, 1996.
- [276] Aline Salvi, Corinne Brühlmann, Eugenia Migliavacca, Pierre Alain Carrupt, Kurt Hostettmann, and Bernard Testa. Protein protection by antioxidants: Development of a convenient assay and structure-activity relationships of natural polyphenols. *Helvetica Chimica Acta*, 85(3):867–881, 2002.
- [277] Catherine Rice-Evans, Nicholas Miller, and George Paganga. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4):152–159, 1997.
- [278] M A Read. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *The American journal of pathology*, 147(2):235–7, 1995.
- [279] Mou-tuan Huang and Thomas Ferraro. Phenolic Compounds in Food and Cancer Prevention. *Analytica chimica acta*, 705(3):8–34, 1992.
- [280] Brigida Fernández de Simón, Javier Pérez-Ilzarbe, Teresa Hernández, Carmen Gómez-Cordovés, and Isabel Estrella. Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9):1531–1535, 1992.
- [281] Ayako Ogawa, Hisako Arai, Hisayuki Tanizawa, Taketsune Miyahara, and Toshimasa Toyo'oka. On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 383(3):221–230, 1999.
- [282] K R Markham. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press Inc., London, 1982.
- [283] Lucilene Dornelles Mello, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, and Lauro Tatsuo Kubota. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 96(3):636–645, 2003.
- [284] Simone S. Rosatto, Lauro T. Kubota, and Graciliano De Oliveira Neto. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Analytica Chimica Acta*, 390(1-3):65–72, 1999.
- [285] Shin Ichiro Imabayashi, Young Tae Kong, and Masayoshi Watanabe. Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. *Electroanalysis*, 13(5):408–412, 2001.

- [286] Adrian Marcelo Granero, Héctor Fernández, Elizabeth Agostini, and María Alicia Zón. An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. *Talanta*, 83(1):249–255, 2010.
- [287] Ruixia Han, Lin Cui, Shiyun Ai, Huanshun Yin, Xianggang Liu, and Yanyan Qiu. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16(2):449–456, 2012.
- [288] Renato S. Freire, Sompong Thongngamdee, Nelson Durán, Joseph Wang, and Lauro T. Kubota. Mixed enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. *The Analyst*, 127(2):258–261, 2002.
- [289] Mendel Friedman. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5):1523–1540, 1997.
- [290] Juan Manuel Cevallos-Cevallos, Russell Rouseff, and José I. Reyes-De-Corcuera. Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. *Electrophoresis*, 30(7):1240–1247, 2009.
- [291] a Claiborne and Irwin Fridovich. “Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of *o*-dianisidine by horseradish peroxidase. 1. Spectral properties of the products of dianisidine oxidation. *American Chemical Society*, 18(11):2324–2329, 1979.
- [292] Mariela Gonzalez, María Laura Tereschuk, P M Albarracín, S Criado, M Montaña, and N A García. Propiedades biológicas y desactivantes de especies oxidantes y especies reactivas de oxígeno de propóleos de Amaicha del Valle. Technical report, Asociación Química Argentina, 2010.
- [293] Aziz Amine, Loubna El Harrad, Fabiana Arduini, Danila Moscone, and Giuseppe Palleschi. Analytical aspects of enzyme reversible inhibition. *Talanta*, 118:368–374, 2014.
- [294] A. Amine, F. Arduini, D. Moscone, and G. Palleschi. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*, 76:180–194, 2016.
- [295] Fabiana Arduini, Francesco Ricci, Catalin S. Tuta, Danila Moscone, Aziz Amine, and Giuseppe Palleschi. Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. *Analytica Chimica Acta*, 580(2):155–162, 2006.
- [296] Aldo Noguera, Ramón Enrique, María Francisca Perera, Santiago Ostengo, Josefina Racedo, Diego Costilla, Silvia Zossi, María Inés Cuenya, María Paula Filippone, Björn Welin, and Atilio Pedro Castagnaro. Genetic characterization and field evaluation to recover parental phenotype in transgenic sugarcane: a step toward commercial release. *Molecular Breeding*, 35(5), 2015.
- [297] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.

- [298] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.
- [299] Agueda Scattolini. Algunas enfermedades de los Cítricos. *Bases conceptuales para el manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades*, pages 213–224, 2003.
- [300] Elsinoë fawcetti. Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.
- [301] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. Diaporthe citri. Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.
- [302] Sistema Nacional Argentino. Mycosphaerella citri. Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.
- [303] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Phytophthora Citrophthora. Technical Report 4, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 1998.
- [304] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Citrus Psorosis Virus. Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.
- [305] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Citrus Tristeza Virus (CTV) (razas NO severas). Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas.
- [306] Sistema Nacional Argentino. Citrus Exocortis Viroid (CEVd). Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas.
- [307] Sistema Nacional Argentino. Xanthomonas citri subsp. citri. Technical report, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2017.