



Tesis Doctoral

**Superficies nanoestructuradas para el
desarrollo de biosensores
electroquímicos e integración en un
sistema de detección portable**

Zorione Herrasti Sainz

Septiembre 2014

Directores: Dra. Eva Baldrich y Dr. Fernando Martínez

Tutor: Dr. Javier Rodríguez

Tesis doctoral

Superficies nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable

Zorione Herrasti Sainz

Directores

Dra. Eva Baldrich Rubio

Dr. Fernando Martínez Rodríguez

Tutor

Dr. Javier Rodríguez Viejo

Programa de doctorado en Ciencias de Materiales

Departamento de Física, Facultad de Ciencias

Universitat Autònoma de Barcelona

Septiembre 2014

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en estas líneas a todas las personas que han contribuido en este trabajo.

Para empezar, tengo que agradecer a mis directores de tesis, Eva Baldrich y Fernando Martínez. A Eva, muchas gracias por ayudarme activamente a sacar adelante este proyecto. No han sido pocas las dificultades a las que nos hemos tenido que enfrentar y siempre me ha ayudado a salir adelante; al final, hemos conseguido el objetivo. A Fernando, gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en el departamento de Sensores de IK4-Ikerlan facilitándome el apoyo de otros departamentos y centros en la realización de este trabajo y por darme la posibilidad de participar en congresos.

Al personal del departamento de Sensores, María, José Mari y Iosu que también han participado en este trabajo y me han ayudado siempre que lo he necesitado, aportando dispositivos de apoyo e ideas. Este trabajo se ha beneficiado, también, de los proyectos de carrera y de máster de Iñaki, Aitor y Erkuden. También agradecer a Jorge, del departamento de Microsistemas, por su gran disponibilidad y por haberme enseñado y ayudado en los trabajos llevados a cabo en la sala blanca.

Durante esta tesis he tenido la oportunidad de hacer varias estancias en el grupo de BioMEMS del IMB-CNM-CSIC y por ello, debo agradecer a todas las personas que han facilitado su realización. También hice una breve estancia en el grupo Nb₄d-ICAQ-CSIC y me gustaría agradecer por la misma razón, a todos los que hicieron posible su realización, especialmente a Enrique Valera por ayudarme y dirigirme en los trabajos realizados durante ese período.

Urte hauetan nire lankide eta lagun izan diren Ekhik, Unai, Erkudenek, Imanolek, Amaiak, Garbiñek, Nereak, Urkok... ere asko lagundu didate lanegunak entretenigarriagoak izaten, gehienbat deskantsuetan eta bazkaltzeko orduan.

Azkenik, nire gurasoei, Mikeli, nire anaiari eta Mainerri eskerrak eman nahi dizkiet beti egon direlako ni laguntzeko eta animatzeko gertu. Eskerrik asko!

Resumen

Los biosensores son elementos clave en el desarrollo de sistemas de diagnóstico *in-vitro* y permiten la fabricación de dispositivos biomédicos miniaturizados para un diagnóstico más rápido y fiable de muchas enfermedades. Con ellos se podrán analizar rápidamente analitos presentes en la sangre, orina, tejidos o saliva y nos informarán de la concentración de determinados componentes (biomarcadores, drogas, antibióticos, virus, etc). Los biosensores también pueden ser aplicados en otros campos, como la alimentación, agricultura, monitorización de procesos industriales y control medio ambiental. Por tanto, el desarrollo de biosensores de bajo coste, pequeños, sensibles y fáciles de usar, repercutirá en el control de enfermedades, la detección de elementos contaminados y toxinas, o la mejora de la producción y control de procesos. La tecnología de los biosensores consiste en sistemas compactos de análisis, compuestos de un elemento de reconocimiento biológico (ADN, anticuerpo, etc.) que detecta un analito (glucosa, antígeno, etc.) y un elemento transductor de esa detección que permite cuantificar la cantidad de analito.

En este trabajo, se han producido biosensores electroquímicos explotando, por un lado, su miniaturización e integración en dispositivos Lab on a Chip (LOC) y, por otro lado, mejorando su sensibilidad mediante el uso de micro-nanomateriales que permiten obtener microsensores electroquímicos avanzados.

De este modo, se ha desarrollado un sistema de detección electroquímica (SDE) portable que se integra en un dispositivo LOC. Este SDE se compone principalmente de un potencióstato y un cartucho microfluídico que contiene un sensor integrado. El funcionamiento de este dispositivo se ha demostrado principalmente en medidas de ADN. Los resultados obtenidos muestran que la respuesta y sensibilidad del potencióstato es comparable a la que se obtiene en un sistema comercial como el Autolab PGSTAT. Además, como la superficie de sensor no requiere de una modificación previa de la sonda de ADN, el dispositivo microfluídico desarrollado puede ser utilizado para detectar cualquier otro analito de interés, como se ha demostrado en las medidas de detección de ácido úrico en solución.

La mejora en la sensibilidad de las medidas electroquímicas, se ha obtenido mediante el atrapamiento magnético de nanotubos de carbono (NTC) sobre la superficie del electrodo de trabajo del sensor usando partículas magnéticas (PMs). Esto permite, por un lado, la obtención rápida y sencilla de superficies nanoestructuradas que mejoran las prestaciones del electrodo y, por otro, sensar la superficie de las PMs de manera eficiente tras la captura del analito de interés de la solución. Este procedimiento de nanoestructuración, que ha resultado aplicable tanto a electrodos

serigrafiados como de capa fina, se ha aplicado con éxito a ensayos de biosensado directo de moléculas electroactivas y no electroactivas, y de marcadores y dianas enzimáticos. En el primer caso, se ha realizado la detección de dopamina, obteniéndose un límite de detección (LOD) lo suficientemente sensible para realizar la estimación de la concentración de dopamina endógena en orina. En el segundo caso, para la detección de analitos no electroactivos (como anticuerpos y detergente), se han usado marcadores no enzimáticos (nanocristales de Cd y ferroceno). Para ello se ha ensayado tanto la detección en formato de sándwich como por “sombreado superficial”, un novedoso procedimiento de detección en que la captura de analito interfiere en la detección de un marcador previamente incorporado sobre las PM. Por último, se ha realizado el biosensado de marcadores enzimáticos (mieloperoxidasa). El LOD obtenido en estas medidas es suficientemente bajo para la aplicación del protocolo al estudio de muestras de suero sanguíneo.

La combinación de las superficies nanoestructuradas y del SDE portable ha resultado en el desarrollo de un dispositivo LOC con electrodos nanoestructurados, para la detección sensible, rápida, portable y potencialmente automatizable de analitos.

Índice general

Abreviaturas	1
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
2.1. Objetivos del proyecto	9
2.2. Estructura de la memoria	10
3. Estado del arte	13
3.1. Biosensores electroquímicos	13
3.1.1. Inmunosensores electroquímicos	14
3.1.2. Sensores electroquímicos de ADN	22
3.2. Nanomateriales y micromateriales en la producción de biosensores mejorados	33
3.2.1. Micropartículas magnéticas y la producción de magneto - biosensores	34
3.2.2. Nanotubos de carbono (NTC) y la producción de electrodos nanoestructurados	38
3.2.3. Nanoestructuración reversible de la superficie del electrodo	46
3.3. Microsistemas analíticos totales (μ TAS)	49
3.4. Técnicas electroquímicas	53
3.4.1. Breve introducción a la electroquímica	53
3.4.2. Técnicas voltamétricas	58
3.4.3. Espectroscopía de impedancia (EIS)	63
4. Materiales, métodos y descripción del sistema	69
4.1. Materiales, biocomponentes y reactivos químicos	69
4.1.1. Reactivos/productos químicos	69
4.1.2. Tampones y soluciones	69
4.1.3. Partículas magnéticas	69
4.1.4. Biocomponentes	70
4.1.5. Substratos enzimáticos	71
4.1.6. Otros componentes y materiales	72
4.2. Sensores electroquímicos utilizados en los ensayos	72
4.2.1. Electrodos serigrafados	72
4.2.2. Electrodos de capa fina fabricados en substrato de pyrex	73

4.2.3.	Fabricación en lámina de COP	76
4.3.	Nanoestructuración de la superficie del electrodo	78
4.3.1.	Preparación de la suspensión de NTC	79
4.3.2.	Manipulación de las PM y modificación con anticuerpo y Fc-COOH	79
4.3.3.	Atrapamiento magnético de NTC	82
4.4.	Descripción del potencióstato desarrollado en IK4-Ikerlan	83
4.4.1.	Potencióstato para medidas en sensor	85
4.4.2.	Potencióstato para medidas en cartucho	86
4.5.	Medidas electroquímicas	86
4.5.1.	Activación de sensores	86
4.5.2.	Comprobación del funcionamiento de los sensores	87
4.5.3.	Voltametrías	87
4.5.4.	Espectroscopía de impedancia (EIS)	88
4.5.5.	Cronoamperometría	89
4.6.	Análisis de datos	89
5.	Desarrollo de un sistema de detección electroquímica portable. Aplicación a la detección de ADN.	91
5.1.	DetECCIÓN electroquímica del ADN	93
5.1.1.	DetECCIÓN de ADN mediante MB	93
5.1.2.	DetECCIÓN de ADN mediante Hoechst 33258	97
5.1.3.	DetECCIÓN electroquímica de ADN usando electrodos modificados con NTC	99
5.2.	Medidas en potencióstato diseñado en IK4-Ikerlan	101
5.3.	DetECCIÓN electroquímica del ADN mediante el azul de metileno en cartucho microfluídico	103
5.4.	Conclusiones	104
6.	Nanoestructuración de electrodos serigrafados	105
6.1.	Introducción	105
6.2.	Biosensado directo de moléculas electroactivas: detección de dopamina (DA)	106
6.2.1.	Descripción y justificación del bioensayo	106
6.2.2.	Optimización de los parámetros de ensayo	108
6.2.3.	DetECCIÓN de DA en presencia de interferentes	115
6.2.4.	Conclusiones	122
6.3.	Biosensado de moléculas no electroactivas usando marcadores no enzimáticos: detección de cristales de CdS	124
6.3.1.	Descripción y justificación del bioensayo	124
6.3.2.	Optimización de los parámetros de ensayo usando PM con grupos tosilo	126
6.3.3.	Optimización de los parámetros de ensayo usando PM con estreptavidina	130

6.3.4.	Obtención de una curva de calibrado para la detección de CdS-rabbit	132
6.3.5.	Conclusiones	133
6.4.	Biosensado de marcadores y dianas enzimáticas: amplificación de la señal en la detección de Mieloperoxidasa (MPO)	135
6.4.1.	Descripción y justificación del bioensayo	135
6.4.2.	Detección espectrofotométrica de MPO	136
6.4.3.	Detección electroquímica de MPO	139
6.4.4.	Amplificación de señal por conexionado con NTC	142
6.4.5.	Aplicación a la detección de MPO en suero sanguíneo	145
6.4.6.	Conclusiones	146
7.	Nanoestructuración de electrodos de capa fina	147
7.1.	Introducción	147
7.2.	Caracterización de los sensores de capa fina modificados con NTC	148
7.2.1.	Caracterización electroquímica	148
7.2.2.	Regeneración y reutilización del electrodo	150
7.3.	Detección de moléculas electroactivas en solución: aplicación a la detección de ácido úrico (AU)	154
7.3.1.	Descripción y justificación del bioensayo	154
7.3.2.	Optimización de la detección electroquímica del AU	154
7.3.3.	Comparación del potencióstato de IK4-Ikerlan con Autolab	159
7.3.4.	Medidas de AU en matrices de muestra compleja	160
7.3.5.	Conclusiones	164
7.4.	Biosensado directo de dianas no electroactivas por “sombreado superficial”	165
7.4.1.	Descripción y justificación del ensayo	165
7.4.2.	Optimización de los parámetros de ensayo	166
7.4.3.	Detección de detergentes	171
7.4.4.	Detección de proteínas	173
7.4.5.	Conclusiones	176
8.	Nanoestructuración de electrodos de capa fina integrados en dispositivos micro uídicos	177
8.1.	Introducción	177
8.2.	Optimización de las condiciones de trabajo	178
8.2.1.	Pretratamiento, manipulación y nanoestructuración en el cartucho micrfluídico	178
8.2.2.	Optimización de las cantidades de PM y NTC	180
8.3.	Aplicación a la detección de ácido úrico (AU) en solución	182
8.4.	Conclusiones	184
9.	Conclusiones y futuras líneas de investigación	187
9.1.	Conclusiones	187

9.2. Futuras líneas	192
-------------------------------	-----

Bibliografía	195
---------------------	------------

A. Anexo	219
-----------------	------------

A.1. Máscaras utilizadas en la tesis diseñadas en CleWin 4	219
--	-----

A.2. Contribuciones científicas	221
---	-----

A.2.1. Publicaciones	221
--------------------------------	-----

A.2.2. Congresos	251
----------------------------	-----

Abreviaturas

AA Ácido ascórbico

ADN Ácido desoxirribonucleico

ALP “Alkaline phosphatase”, fosfatasa alcalina

APN Ácido péptidonucleico

AQDS Ácido de antraquinona 2,6-disulfónico

AQMS Ácido de antraquinonamonosulfónico

ARN Ácido ribonucleico

Au-SPE “Gold SPE”, electrodo serigrafiado de oro

AuNP Nanopartícula de oro

AU Ácido úrico

BSA “Bovine Serum Albumin”, albúmina de suero bovino

C-SPE “Carbon SPE”, electrodo serigrafiado de carbono

Cdl “Double layer capacitance”, capacitancia de la doble capa

COP “Cyclic Olefin Polymer”, polímero de olefina cíclica

CVD “Chemical Vapour Deposition”, deposición química de vapor

CV “Cyclic Voltammetry”, voltametría cíclica

DA Dopamina

dhADN Hebra doble de ADN

DMF N,N-Dimetilformamida

DPV “Differential Pulse Voltammetry”, voltametría de pulso diferencial

EDC 1-etilo-3-[3-dimetilaminopropilurea] carbodiimida clorhidrato

EIS “Electrochemical Impedance Spectroscopy”, espectroscopía electroquímica de impedancia

ELISA “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Fc-COOH Ferroceno carboxilado

FeCN Ferrocianuro de potasio

FET “Field Effect Transistor”, transistor de efecto campo

GCE “Glassy Carbon Electrode”, electrodo de carbón vitrificado

HOMO “Highest Occupied Molecular Orbital”, orbital molecular ocupado de más energía

HPLC “High Performance Liquid Chromatography”, cromatografía líquida de alta absorción

HRP “Horseradish peroxidase”, peroxidasa de rábano picante

IgG Anticuerpo del tipo inmunoglobulina G

Ipa, Ipo_x Pico de oxidación o anódico

Ipc, Ipre_d Pico de reducción o catódico

IUPAC “International Union of Pure and Applied Chemistry”, unión internacional de química pura y aplicada

K_d Constante de disociación

LOC “Lab On a Chip”

LOD “Limit Of Detection”, límite de detección

LOQ “Limit Of Quantification”, límite de cuantificación

LUMO “Lowest Unoccupied Molecular Orbital”, orbital molecular desocupado de más baja energía

MB “Methylene Blue”, azul de metileno

MPO Mieloperoxidasa

MWCNT “Multi Walled Carbon Nanotubes”, nanotubos de carbono multicapa

NHS N-hidroxysuccinimida

- NPM** Nanopartícula magnética
- NTC** Nanotubos de carbono
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- PBST** PBS 0,01M, pH 7.4 suplementado con tween 0,05 %
- PBS** “Phosphate Buffered Saline”, tampón de fosfato salino
- PCR** “Polymerase Chain Reaction”, reacción en cadena de la polimerasa
- pI** Punto isoelectrico
- pKa** Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
- PM** Micropartícula magnética
- POC** “Point Of Care”
- PSA** “Pressure Sensitive Adhesive”, adhesivo sensible a la presión
- PVP** Polivinilpirrolidona
- QD** “Quantum Dot”, punto cuántico
- Rct** “Charge transfer resistance”, resistencia de transferencia de carga
- rpm** Revoluciones por minuto
- Rs** Resistencia de la solución
- SEM** “Scanning Electron Microscope”, microscopio electrónico de barrido
- shADN** Hebra simple de ADN
- SPE** “Screen Printed Electrode”, electrodo serigrafiado
- STM** “Scanning Tunneling Microscope”, microscopio de barrido de efecto tunel
- SWCNT-COOH** SWCNT con grupos carboxilo
- SWCNT** “Single Walled Carbon Nanotubes”, nanotubos de carbono monocapa
- SWV** “Square Wave Voltametry”, voltametría de onda cuadrada
- TICs** Tecnologías de la Información y Comunicación
- TMB** 3,3',5,5' tetrametilbencidina

UV Ultravioleta

%CV Coeficiente de variación

μ TAS Microsistemas analíticos totales

μ Promedio de al menos 3 medidas independientes

Desviación estándar

Velocidad de barrido

1. Introducción

El último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre estadísticas sanitarias mundiales recalca que, en los últimos decenios, la esperanza de vida ha mejorado mucho en el mundo [1]. Un niño y una niña nacidos en 2012 tendrían, por término medio, una esperanza de vida de 68,6 y 72,1 años, respectivamente. Esto supone 6 años más que la media mundial de la esperanza de vida para los nacidos en 1990. Sin embargo, la duración real de la vida de un individuo depende mucho de donde haya nacido. Así, un niño nacido en 2012 en un país de ingresos altos tiene una esperanza de vida de 75,8 años, es decir, como mínimo 15 años más que un niño nacido en un país de ingresos bajos (60,2 años). En el caso de las niñas la diferencia es aún mayor. Ellas viven 18,9 años más en países con ingresos altos (82,0 años) que en los de ingresos bajos (63,1 años). En la Figura 1.1 se muestran las 20 principales causas de muerte prematura de hombres y mujeres a nivel mundial. De entre ellas, las tres causas que producen un mayor índice de muerte prematura en ambos sexos son, por este orden, las cardiopatías coronarias, las infecciones de las vías respiratorias y los accidentes vasculares cerebrales. Resulta digno de mención que se trata de tres tipos de patologías en las que un diagnóstico precoz acertado mejora significativamente el pronóstico del paciente.

El aumento de la esperanza de vida de la población se debe en parte a la mejora de los recursos sanitarios, pero apunta también a la necesidad de seguir perfeccionando las herramientas existentes para el biodiagnóstico, monitorización y terapia de enfermedades, incidiendo especialmente en su aplicabilidad a nivel mundial. Por otra parte, el aumento de la esperanza de vida en los países más desarrollados ha generado también un envejecimiento de la población. Esto genera preocupación a nivel de gobiernos, servicios socio-sanitarios y profesionales de la salud, ya que en un futuro cercano habrá que cubrir todas las necesidades de cuidados y atención que reclamará un número creciente de ciudadanos de edad avanzada. Por consiguiente, la investigación y desarrollo de dispositivos de biosensorización portables (Point of Care, POC) y Tecnologías de la Información y Comunicación (TICs) al servicio de la salud es de vital importancia.

En este contexto, los recientes avances en las TICs están permitiendo el desarrollo de novedosos sistemas de detección, capaces de identificar y monitorizar constantes vitales y señales biológicas incluso de manera no invasiva y/o remota. En paralelo se han podido desarrollar softwares más avanzados para el almacenamiento, procesamiento y análisis de los datos registrados, así como para la transmisión de la información generada entre paciente y médico. Esto sienta las bases para el futuro

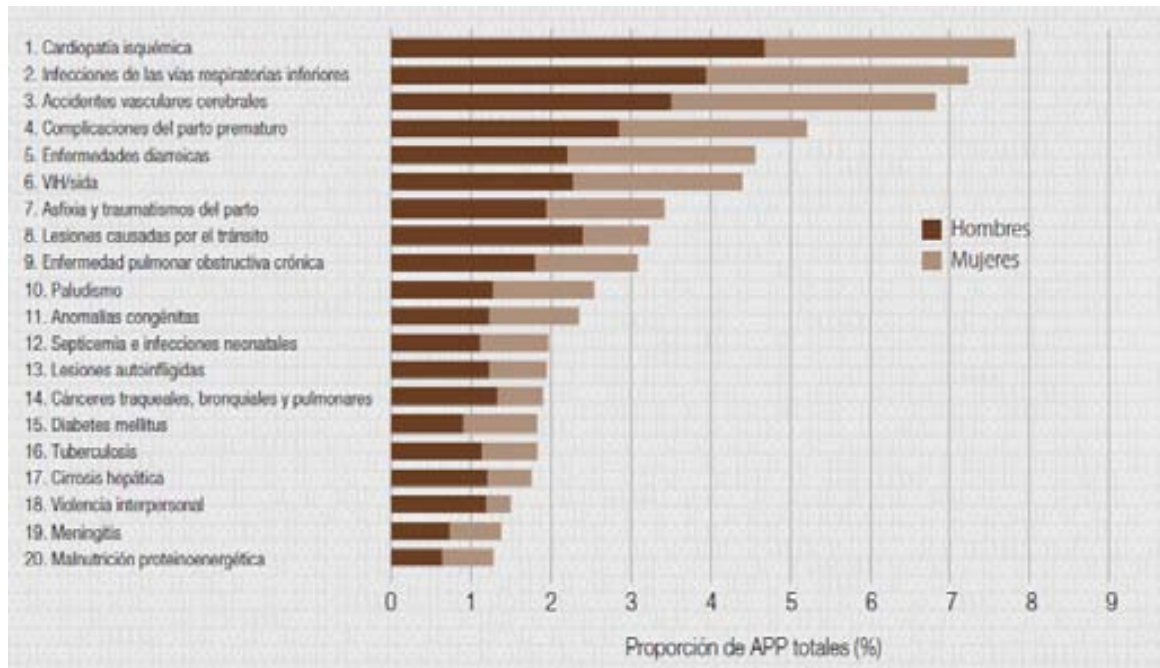


Figura 1.1.: Las 20 principales causas de muerte prematura de hombres y mujeres a nivel mundial en 2012 según datos de la OMS [1].

establecimiento de tratamientos personalizados y el seguimiento remoto de pacientes en su propio domicilio.

Los dispositivos POC por su parte ofrecen numerosas ventajas respecto a otros sistemas de diagnóstico. Por ejemplo, de un POC se espera que sea extremadamente fácil de usar, lo que garantiza que pueda ser utilizado por personal no especialmente cualificado o entrenado, en prácticamente cualquier emplazamiento, y con requerimientos técnicos mínimos. Es por ello que la utilización de este tipo de sistemas podría acelerar la toma de decisiones clínicas, reducir el tiempo de respuesta y análisis de los tests y facilitar el tratamiento y el cuidado de los pacientes fuera de las instalaciones sanitarias centrales. A pesar de esto, mientras el mercado global del diagnóstico se espera que sobrepase los 50 billones de dolares en 2014, la comercialización de dispositivos de tipo POC solo supone una pequeña fracción de este mercado (alrededor del 12%; Figura 1.2) [2].

En términos generales el mercado potencial de los dispositivos de diagnóstico de tipo POC se agrupa alrededor de 10 temáticas o áreas de aplicación diferentes, que corresponderían a la monitorización de glucosa, química y electrolitos de la sangre, embarazo y fertilidad, marcadores cardíacos/cardiovasculares, drogas y alcohol, enfermedades infecciosas, colesterol, hemoglobina/hemostasis, química de la orina y marcadores tumorales. Sin embargo, hoy por hoy, la aplicación mayoritaria de los POC comerciales sigue siendo la detección de glucosa en sangre, uno de los grandes iconos del sector. El mercado global de dispositivos de monitorización continua de glucosa generó unos ingresos de 165,8 millones de dólares en 2010 y 183,7 millones de

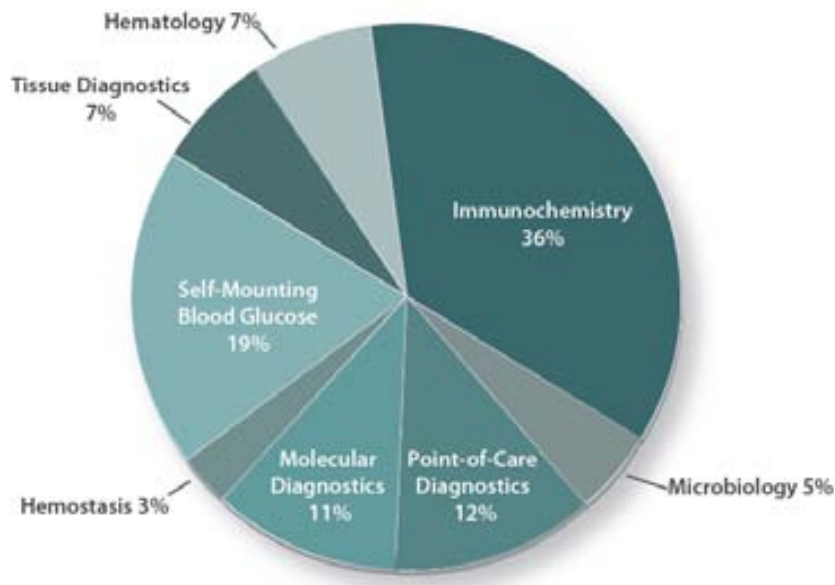


Figura 1.2.: Mercado global del diagnóstico *in vitro* 2012 [2].

dólares en 2011. De este modo, se espera que genere unos ingresos de 356,5 millones de dólares el año 2016. No obstante, e independientemente de los factores económicos y de mercado, el paciente diabético de hoy en día, que a diferencia de otros pacientes precisa de autocuidados diarios para prevenir las graves complicaciones asociadas al control inadecuado de la enfermedad (como la ceguera, la insuficiencia renal, las amputaciones o las enfermedades cardiovasculares) ha sido uno de los grandes beneficiados de la creación de estos dispositivos. De este modo, es el paciente el que finalmente se beneficia de una gestión apropiada de la enfermedad crónica y aprovecha las tecnologías disponibles para mejorar su calidad de vida y el cuidado de su salud. La implementación de dispositivos de tipo POC también puede suponer una reducción de costes en la sanidad, tanto para los pacientes como para los centros hospitalarios. El envejecimiento de la población ha supuesto un incremento en el coste de sanidad, lo que ha generado la necesidad de realizar el cuidado de la salud de los pacientes desde sus hogares. De este modo, los gobiernos europeos han creado iniciativas para promover el control y cuidado remoto de los pacientes. Así, Alemania dispone del mayor mercado europeo en el cuidado de pacientes desde sus hogares, seguido de Francia y Reino Unido. Las principales empresas europeas de este sector son Philips Healthcare (Holanda), Fresenius SE & Co KGaA (Alemania), GE Healthcare (Reino Unido), B. Braun (Alemania), Roche (Suiza), Air Liquide (Francia), Bupa Home Healthcare, Ltd. (Reino Unido), Healthcare at Home (Reino Unido) y Linde Group (Alemania).

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los beneficios que generan los dispositivos POC y las TICs al servicio de la salud, existe una necesidad de implementar estos en los servicios de salud de los países que puedan permitirse su coste. En paralelo, los POC pueden aportar también una mejora substancial en la calidad de vida de

los individuos de los países con ingresos bajos ya que permiten realizar tests sin necesidad de laboratorios altamente equipados y personal especializado.

2. Objetivos

2.1. Objetivos del proyecto

Los principales objetivos de esta tesis son el desarrollo de un método simple, de bajo coste y rápido de nanoestructuración de la superficie de electrodos para la mejora en la sensibilidad de detección electroquímica de distintos analitos y el desarrollo de un sistema de detección electroquímica portable.

El trabajo realizado a lo largo de esta tesis se ha sustentado en base a estos objetivos y al conocimiento y trabajo previos realizados en IK4-Ikerlan y en el *Institut de Microelectrònica de Barcelona* (IMB-CNM, CSIC). En IK4-Ikerlan se disponía de un sistema Lab On a Chip (LOC) para la detección óptica del ADN. Este dispositivo detectaba ópticamente el ADN tras realizar su amplificación por PCR en este mismo dispositivo. Debido al alto coste de los transductores ópticos, se decidió producir como alternativa un sistema de detección electroquímica del ADN. Por otro lado, en IMB-CNM se había desarrollado un método de nanoestructuración de sensores electroquímicos, que se había observado mejoraba la sensibilidad en la detección electroquímica de algunos analitos. Aunque este sistema se había aplicado mayoritariamente a la modificación de electrodos serigrafiados comerciales para detectar moléculas electroactivas en solución, algunos resultados preliminares indicaban que el atrapamiento magnético de los NTC producía como resultado un conexionado eléctrico de las PM y permitía el sensado de la superficie de las mismas. Sin embargo, su potencial y aplicabilidad en la detección de distintos tipos de ensayos electroquímicos no se había podido estudiar en profundidad.

De este modo, este proyecto ha constado de dos apartados diferenciados en un principio, que al final del trabajo se han combinado en un tercer apartado, en el que se ha llevado a cabo la nanoestructuración de dispositivos microfluídicos en un sistema de detección electroquímica portable. Los objetivos concretos propuestos en cada uno de estos apartados se detallan a continuación.

Desarrollo de un sistema LOC de detección electroquímica portable

- Fabricación de sensores microfabricados mediante técnicas fotolitográficas estándar en la sala blanca de IK4-Ikerlan y producción de sensores integrados en un cartucho microfluídico.
- Demostración de la aplicabilidad y funcionamiento del LOC:

- Detección electroquímica de ADN en un cartucho microfluídico con el potenciostato portable producido en IK4-Ikerlan.

Nanoestructuración de electrodos mediante atrapamiento magnético de NTC

- Nanoestructuración de electrodos serigrafiados comerciales con NTC para la optimización de bioensayos mediante el sensado directo sobre las PM. Demostración de su aplicabilidad y funcionamiento en distintos ensayos:
 - Detección de dianas electroactivas: aplicación al sensado directo de dopamina.
 - Biosensado directo de dianas no electroactivas mediante ensayos en formato de sándwich usando marcadores no enzimáticos: detección de nanocristales de cadmio sin disolución ácida.
 - Detección de marcadores y/o dianas enzimáticas: aplicación a la detección de mieloperoxidasa.
- Nanoestructuración de electrodos de capa fina con NTC para la producción reversible de electrodos mejorados. Demostración de su aplicabilidad y funcionamiento:
 - Producción, caracterización y estudio de reutilización y reproducibilidad en ferrocianuro.
 - Detección de dianas electroactivas en solución: aplicación a la detección de ácido úrico.
 - Biosensado directo de dianas no electroactivas por “sombreado superficial”: detección de detergentes y dianas proteicas.

Nanoestructuración de electrodos integrados en un cartucho micro uídico usando un sistema de detección electroquímica portable

- Desarrollo de un protocolo de nanoestructuración de electrodos integrados en dispositivos microfluídicos.
- Demostración de su aplicabilidad y funcionamiento: detección de dianas electroactivas en solución usando como modelo el ácido úrico.

2.2. Estructura de la memoria

Este documento está estructurado en nueve capítulos más los anexos.

El Capítulo 1 es una corta introducción, en la que se destaca la necesidad que existe a nivel mundial del desarrollo y aplicación de sistemas Point of Care (POC) y

tecnologías de información y comunicación (TICs) al servicio de la salud. A continuación se enumeran los objetivos concretos de los distintos paquetes de trabajo o actividades que han dado forma a esta tesis, Capítulo 2. En el Capítulo 3 se presenta el estado del arte, incluyendo una revisión de la literatura de biosensores electroquímicos, nano- y micro-materiales y microsistemas analíticos totales, así como los conceptos teóricos de las técnicas electroquímicas que se han utilizado a lo largo de este trabajo. En el siguiente capítulo, Capítulo 4, se hace una descripción de los reactivos, materiales y procedimientos utilizados y también se detalla el proceso de microfabricación de sensores llevado a cabo en esta tesis. Por otro lado, se describe el potencióstato portable desarrollado y fabricado en paralelo a esta tesis en IK4-Ikerlan y que se utiliza como sistema de validación de la aplicabilidad de los resultados obtenidos a un sistema LOC portable.

Los resultados y la discusión de estos se presentan en los capítulos 5-8. El Capítulo 5 muestra la detección electroquímica de ADN, que primeramente se realiza en sensores electroquímicos “externos” y finalmente en sensores integrados en un cartucho microfluídico, utilizando el potencióstato portable desarrollado en IK4-Ikerlan. En el Capítulo 6 y Capítulo 7 se describe la nanoestructuración de electrodos serigrafados y de capa fina, respectivamente, y se analiza su aplicabilidad en distintos ensayos electroquímicos. Finalmente, en el Capítulo 8 se nanoestructura el electrodo integrado en el cartucho microfluídico y se demuestra su funcionamiento.

Las conclusiones finales y las líneas futuras del trabajo se presentan en el Capítulo 9. La memoria de tesis termina con la bibliografía y una serie de anexos, en los que se ha incluido el diseño de las máscaras fotolitográficas utilizadas en el trabajo y las contribuciones científicas producidas durante este proyecto: ponencias en congresos y artículos publicados. Para facilitar la lectura del manuscrito, se ha incluido al principio del mismo un listado con las abreviaturas más utilizadas.

3. Estado del arte

3.1. Biosensores electroquímicos

Un biosensor es un dispositivo analítico compacto capaz de convertir la interacción de un determinado analito en una señal eléctrica. Para ello el biosensor incorpora un elemento de reconocimiento de origen biológico o bioreceptor, que puede ser natural o creado artificialmente (por ej., anticuerpos, sondas de ácidos nucleicos, péptidos, aptámeros, bacteriófagos, o incluso microorganismos o células enteras), integrado o estrechamente asociado a un transductor fisicoquímico. El objetivo de un biosensor es proporcionar una señal eléctrica continua o discreta, que sea proporcional a la cantidad de analito presente en una muestra, pero no se vea afectada por la presencia del resto de componentes de la misma. Es decir, que genere una respuesta rápida y específica [3].

El mecanismo general de sensado bioquímico se basa en el reconocimiento molecular específico entre el bioreceptor y su analito. Este se puede acoplar a diferentes estrategias de transducción basadas en efectos electroquímicos, ópticos, gravimétricos, magnéticos o térmicos. Ello permite, convertir los cambios causados por la interacción del analito en un parámetro fisicoquímico y posteriormente en una señal eléctrica que se convertirá a una información digital (Figura 3.1). De entre los formatos de transducción existentes, los sensores electroquímicos destacan por producir métodos analíticos precisos, rápidos y baratos, con la ventaja de que son fácilmente ensamblados e integrados con los componentes electrónicos [4, 5]. Al contrario de lo que ocurre con otros tipos de transductores (como los ópticos y gravimétricos), los sensores electroquímicos generan una señal eléctrica directamente, con lo cual no se necesitan equipos de transducción de señal tan sofisticados y caros. Prueba de ello es que los equipos de medida electroquímica se cuentan entre los más robustos, compactos y económicos disponibles comercialmente. Es gracias a esto que los sensores electroquímicos han tenido un alto impacto en áreas tan diversas como el diagnóstico, la monitorización medioambiental o el control alimentario.

La historia de los biosensores electroquímicos tiene su origen en los trabajos pioneros del Profesor Leland C Clark Jnr., que hoy en día es considerado el padre de los biosensores [6]. Clark publicó en 1953 un artículo en el que describía un electrodo, conocido en la actualidad como el electrodo de Clark, capaz de medir oxígeno disuelto en sangre y otros fluidos. Su trabajo sentó las bases para el desarrollo del que sería el primer biosensor comercial, el sensor de glucosa producido en 1973 por la compañía Spring Instruments (Yellow Spring, OH, USA). Este dispositivo detectaba la glucosa

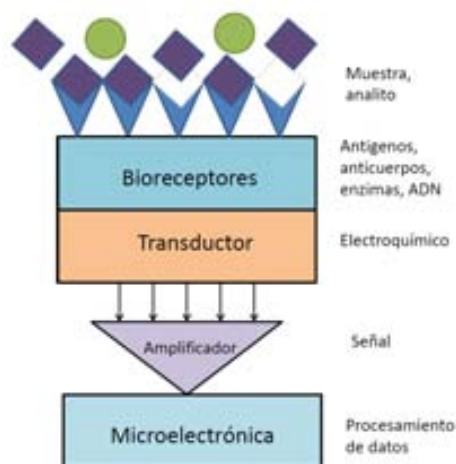


Figura 3.1.: Esquema general de un biosensor electroquímico.

en muestras de sangre, un avance tecnológico que tras décadas de desarrollo habría de permitir el control diario de los niveles de azúcar a millones de pacientes diabéticos en todo el mundo. En el año 2005, la combinación de sensores enzimáticos de bajo coste producidos por serigrafía (en inglés "screen printing") y los amperímetros de bolsillo daban forma a un dispositivo portable, que dominaba con 5 billones \$ / año el mercado de la monitorización de la diabetes [7].

3.1.1. Inmunosensores electroquímicos

Según la IUPAC, “un inmunosensor es un dispositivo integrado, que consiste en un elemento de reconocimiento inmunoquímico, en contacto directo con un elemento transductor”. Los inmunosensores utilizan anticuerpos como elemento biológico de reconocimiento, aunque a menudo se aplica el mismo término a los dispositivos que incorporan un antígeno para la detección de anticuerpos contra el mismo.

3.1.1.1. Breve introducción a los anticuerpos, la inmunocaptura y los inmunoensayos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas producidas en los animales por un tipo de célula sanguínea, los linfocitos B, como parte de la respuesta inmunológica que se dispara frente a la presencia de una sustancia desconocida, a la que se denomina un antígeno. De este modo, el anticuerpo producido tendrá afinidad específica por ese antígeno y tendrá como misión unirse a él para facilitar su eliminación. En la Figura 3.2 se muestra la representación esquemática de un anticuerpo de tipo IgG. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño. Aunque la estructura general de todos los

anticuerpos es muy semejante, una pequeña porción del ápice de la proteína es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno con un extremo ligeramente distinto. Será esta porción variable la que permita que un anticuerpo tenga una afinidad específica por un antígeno.

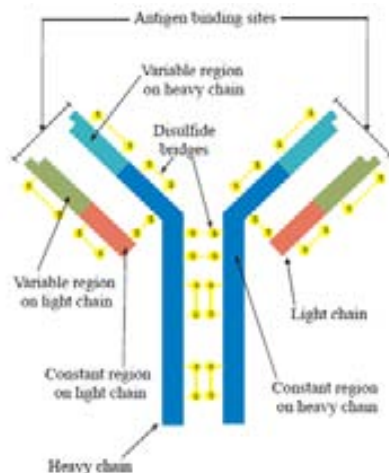


Figura 3.2.: Ejemplo de representación esquemática de un anticuerpo de tipo IgG con su típica forma de Y, donde se ven sus cadenas pesadas (heavy chain) y sus cadenas ligeras (light chain).

Los protocolos de producción, purificación y modificación de anticuerpos para su uso en la detección específica de antígenos se generaron durante los años 70 y 80, y hoy en día siguen relativamente vigentes. Para esta producción, se inyecta un antígeno en un mamífero y la sangre aislada de estos animales contendrá anticuerpos policlonales. Estos son múltiples anticuerpos que se unen a diferentes segmentos o epítomos del mismo antígeno. Si se desea obtener anticuerpos específicos para un único epítomo de un antígeno, se aíslan linfocitos secretores de anticuerpos de un animal y se immortalizan fusionándolos con una línea celular cancerosa. Las células fusionadas se denominan hibridomas y continuarán creciendo y secretando anticuerpo en el cultivo. Se aíslan las células de hibridoma individuales mediante clonado por dilución para generar clones que produzcan todos el mismo anticuerpo. A estos anticuerpos se les denomina anticuerpos monoclonales [8, 9].

Los inmunoensayos sacan provecho de la especificidad y eficiencia de esta interacción en un formato de ensayo en que, dependiendo del analito (antígeno o anticuerpo) que se quiera detectar, se utilizará como elemento de reconocimiento su antígeno o anticuerpo correspondiente. El inmunoensayo por excelencia es el ELISA (del inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"), en el que la interacción antígeno-anticuerpo se detecta indirectamente utilizando algún tipo de marcador enzimático. Para ello, en la mayoría de los casos se inmoviliza un primer anticuerpo o moléculas de antígeno modificadas sobre una superficie de captura (como las paredes de los pozos de una placa de ELISA). Esto permite realizar lavados tras la inmunocaptura

para eliminar posibles interferentes pobremente adsorbidos sobre la superficie. Como la mayoría de bioreceptores y analitos no producen por sí mismos ningún tipo de señal directamente detectable, se suele usar un segundo bioreceptor modificado con algún tipo de marcador [10]. Lo más habitual es usar como marcador una enzima (habitualmente fosfatasa alcalina o peroxidasa) que convierte un substrato enzimático incoloro en un producto medible [11], normalmente un cromóforo coloreado o fluorescente, que puede ser detectado espectrofotométricamente.

Otro inmunoensayo ampliamente utilizado es el ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. Este, al contrario del ELISA, no requiere un proceso de lavado tras la inmunocaptura. La reacción antígeno-anticuerpo y la limpieza de los reactivos se realiza mediante separación cromatográfica. En este caso, el anticuerpo marcado y la muestra fluyen a través de un canal hasta la línea de captura y, aquí, interaccionan con el anticuerpo de captura, el cual ha sido previamente inmovilizado en una membrana. El resultado del ensayo se evalúa visualmente con una línea de test y otra de control. La principal ventaja de estos ensayos es su rapidez de respuesta y facilidad de uso, sin embargo, sus resultados no son cuantificables y no alcanzan la sensibilidad necesaria para muchas aplicaciones [12].

3.1.1.2. Formatos de inmunoensayo

En la literatura se describen varios formatos de inmunoensayo, algunos de los cuales se muestran en la Figura 3.3 [13, 14]. El más sencillo de todos es el inmunoensayo homogéneo, en el que los antígenos/anticuerpos marcados y el analito de estudio están mezclados en la solución (Figura 3.3.a). En este formato de ensayo la inmunocaptura produce directamente cambios en la señal producida por el marcador. La detección de estos inmunoensayos se hace en la misma muestra, diluida o no, lo cual facilita enormemente el estudio de muestras reales en tiempo real, aún a costa de sensibilidad reducida. Posiblemente el ejemplo de ensayo homogéneo más conocido es el ensayo de agregación o aglutinación del látex. En este ensayo se emplean microesferas de látex conjugadas a dos o más anticuerpos específicos contra diferentes epítomos de un mismo antígeno. En presencia de antígeno, la inmunocaptura produce reacción cruzada entre esferas y agregación de las mismas, generando cambios ópticos en la solución. Otro ejemplo es la utilización de bioreceptores conjugados a fluoróforos o enzimas alostéricas. En tales casos, la interacción con el ligando induce directamente cambios en la emisión de fluorescencia o en la actividad enzimática, respectivamente [15].

Con todo, la mayoría de los inmunoensayos son heterogéneos (Figura 3.3.b-d). En este caso, por lo menos uno de los bioreceptores se encuentra inmovilizado sobre una superficie sólida (por ej, sobre las paredes de los pozos de una placa de ELISA). La inmunocaptura del analito se produce en la muestra, diluida o no, pero la detección se realiza en otro medio, tras un proceso de lavado en el que se han eliminado los posibles interferentes. Estos inmunoensayos pueden ser, en términos generales, competitivos o no competitivos (también llamados de tipo *sandwich*). En

un inmunoensayo no competitivo un primer anticuerpo o grupo de anticuerpos está inmovilizado en una superficie sólida. El antígeno y un segundo anticuerpo, que detecta un epítipo diferente al que reconoce el primer anticuerpo, se añaden a la solución (Figura 3.3.b). De esta forma, el antígeno queda atrapado o confinado entre los dos anticuerpos. La detección de un inmunoensayo de tipo *sandwich* puede hacerse de forma directa o indirecta. En el primer caso se usa un anticuerpo en solución que ha sido modificado con un marcador. Sin embargo en la detección indirecta se usa un segundo anticuerpo sin modificar y un tercer anticuerpo marcado, que reacciona específicamente con el anterior. Esta última estrategia resulta más larga y tediosa, pero suele generar límites de detección mejores (porque el segundo anticuerpo no ha sido modificado químicamente y mantiene su afinidad intacta) y es la estrategia de referencia cuando no es posible obtener o producir anticuerpos marcados contra el antígeno. Por último, en el esquema competitivo se utilizan dos métodos. Uno, en el que la competición ocurre entre el antígeno que está libre en solución y las moléculas de antígeno que han sido inmovilizadas en la superficie por el anticuerpo marcado en solución (Figura 3.3.c). Otro, en el que el anticuerpo está inmovilizado en la superficie y la competición ocurre entre el antígeno que están en solución y una variante del antígeno conjugada a un marcador (Figura 3.3.d).

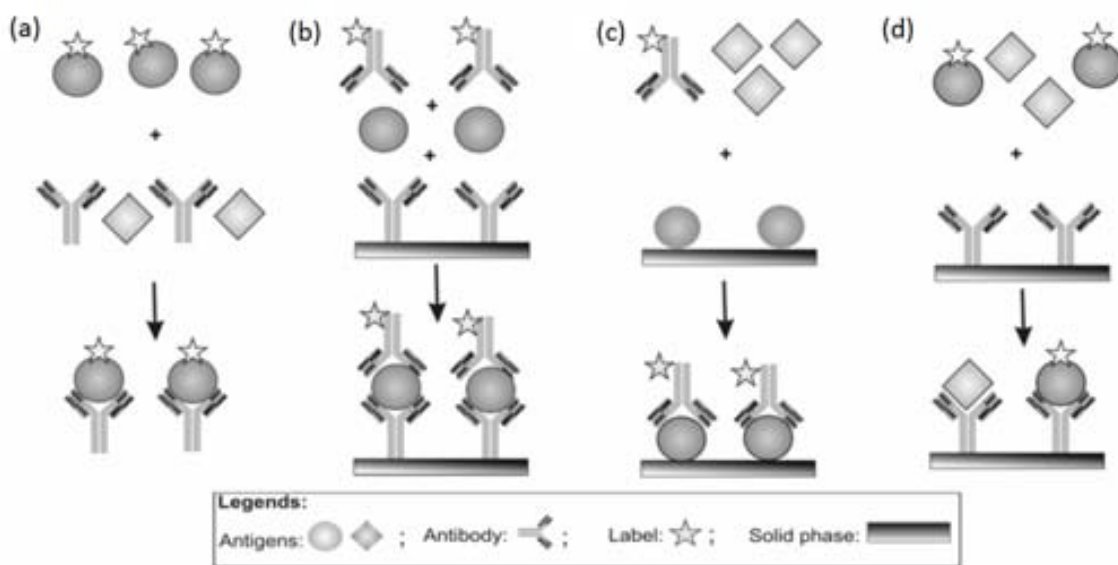


Figura 3.3.: Representación esquemática de diferentes formatos de inmunoensayo: (a) homogéneo; (b) heterogéneo no competitivo de tipo *sandwich* con detección directa; (c) y (d) heterogéneo competitivo [13].

Las técnicas de inmunoensayo descritas suelen ser usadas por personal especializado, principalmente en hospitales o en laboratorios equipados. De este modo, se utilizan primordialmente en análisis clínicos y diagnóstico médico. Sin embargo, también se aplican en el control medioambiental [16] y el control alimentario [17].

3.1.1.3. Formatos de inmunosensor

Si bien el campo de los inmunosensores tiene muchos puntos en común con el de los inmunoensayos, los recientes avances en la producción de nanomateriales y la microfabricación han posibilitado la puesta a punto de métodos de inmunofuncionalización de superficies de mejor rendimiento, la búsqueda de marcadores alternativos y la fabricación de transductores miniaturizados mejorados, dando forma a métodos y dispositivos más simples y fáciles de usar. Esto anticipa que en un futuro cercano los biosensores podrían competir con fuerza en todos los campos en que hoy en día predominan los inmunoensayos [18].

Dependiendo del elemento transductor que incorpora un inmunosensor, este puede ser óptico (por ej. la resonancia de plasmones en superficie (SPR)), las guías ópticas (nanograttings) o los microarrays), piezoeléctrico (por ej. la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) o los cantilevers), magnético (como el sensor magnético-resistivo gigante o GMR) o electroquímico. Pero en este apartado nos centraremos en los inmunosensores electroquímicos, que son los que se han desarrollado a lo largo de esta tesis. Los inmunosensores electroquímicos ofrecen grandes ventajas comparados con otros sistemas de transducción: alta sensibilidad, compatibilidad con técnicas de microfabricación, reducido consumo energético, bajo coste e instrumentación compacta [19].

Los primeros inmunosensores electroquímicos que se desarrollaron en los años 70 se basaban en formatos de inmunoensayo clásico de tipo *sandwich* como el ELISA [20, 21]. De igual forma, un inmunosensor incorpora un bioreceptor de captura inmovilizado sobre la superficie del transductor y, en muchos casos, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta indirectamente utilizando algún tipo de marcador [22]. Para ello es habitual emplear marcadores enzimáticos como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, aunque otras enzimas como la glucosa oxidasa, la ureasa, o la α -galactosidasa, por citar algunos ejemplos, también han sido usados extensamente. En todos los casos se trata de enzimas que convierten un cierto sustrato enzimático en un producto electroactivo. Sin embargo un número creciente de ejemplos describe la utilización de marcadores no enzimáticos, como las moléculas electroactivas, las nanopartículas metálicas o los nanocristales semiconductores, que son detectados en un solo paso, sin necesidad de añadir sustrato, y son a menudo más estables en un rango más amplio de condiciones de ensayo y detección que los marcadores enzimáticos [22]. Finalmente, también se puede detectar la interacción antígeno-anticuerpo sin necesidad de marcador, mediante transducción directa. El ejemplo más extendido es la detección mediante técnicas impedimétricas (Subsubsección 3.1.1.5). Es más, la implementación de micro- y nanodispositivos, estructuras microfluídicas y/o nanomateriales y materiales nanoestructurados está permitiendo la puesta a punto de novedosos inmunosensores de funcionamiento mejorado que presentan, entre otros, tiempos de ensayo cortos, alta especificidad y límites de detección bajos [18, 23]. Hasta el momento se han descrito en la bibliografía un elevado número de inmunosensores electroquímicos basados en diversos formatos de ensayo y para la detec-

ción de una gran variedad de analitos, incluyendo hormonas, fármacos, drogas de abuso, biomarcadores diagnósticos, enzimas, sustratos enzimáticos, virus, bacterias, o células. Los artículos científicos publicados recientemente describen sensibilidades muy altas en el reconocimiento biomolecular mediante técnicas electroquímicas, utilizando electrodos con nuevos materiales como nanotubos de carbono (NTC) y partículas magnéticas (PM) (Subsubsección 3.2.2.2). Las diferentes estrategias de detección electroquímica citadas previamente serán desarrolladas en más detalle a continuación.

3.1.1.4. Inmunosensores de detección indirecta de la interacción antígeno-anticuerpo mediante la utilización de marcadores

Detección mediante marcadores enzimáticos

El buen funcionamiento de los ensayos de ELISA ópticos ha fomentado la utilización de métodos de detección basados en enzimas. Esto es porque la actividad de la enzima a lo largo del tiempo contribuye de alguna forma a la amplificación de señal, sobre todo respecto a la detección de marcadores moleculares coloreados, fluorescentes o electroactivos. Por eso, los anticuerpos modificados con la enzima HRP (del inglés “horseradish peroxidase”) y fosfata alcalina (ALP) son muy utilizados también en electroquímica, aunque otras enzimas como la glucosa oxidasa, la ureasa o la β -galactosidasa han sido extensamente empleados para este fin. En el caso de inmunosensores electroquímicos, para llevar a cabo la detección es necesario que el producto enzimático sea electroactivo o genere un cambio en las propiedades eléctricas del medio. Por ejemplo, la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa y produce peróxido de hidrógeno y *D*-glucono- δ -lactona, el primero de los cuales puede ser detectado cronoamperométricamente, y la ALP genera *p* aminofenol a partir del *p*-aminofenil fosfato, lo cual puede ser detectado amperométrica y voltamétricamente [24]. La ureasa, por su parte, cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco. Esta reacción genera un cambio en el pH del medio que puede ser detectado monitoreando el potencial de circuito abierto de algunos electrodos [25]. En algunos casos, como en el de la HRP, la detección electroquímica se sustenta en la incorporación de un mediador de redox a la reacción [26, 27]. En este caso la HRP catalizará la oxidación del mediador acoplada a la reducción del H_2O_2 y después se medirá la reducción del mediador en el electrodo. Se han dedicado muchos esfuerzos a la búsqueda de sustratos enzimáticos y mediadores de redox que consigan las sensibilidades necesarias para la detección electroquímica de las reacciones enzimáticas [24, 28, 29].

La mayoría de los inmunosensores electroquímicos que emplean HRP utilizan como mediador de redox la hidroquinona [29] o el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) [28], pero el último presenta la ventaja de no ser tóxico para los seres humanos ni peligroso para el medioambiente. La Figura 3.4 ilustra esta reacción enzimática que, como ya se ha comentado, cataliza la oxidación del TMB acoplada a la reducción del H_2O_2 . El TMB oxidado (TMB_{ox}) se mide entonces sobre la superficie del electrodo

mediante su reducción amperométrica a un potencial fijo, que normalmente oscila entre -0.1 V y $+0.1$ V dependiendo del material de los electrodos de trabajo y referencia que se utilicen. Hoy en día se pueden encontrar soluciones comerciales preparadas de *TMB* H_2O_2 optimizadas para la detección espectrofotométrica de la enzima HRP que, como se mostrará en el Capítulo 6 de esta tesis, pueden ser también empleadas para su detección electroquímica, lo que facilita la misma.

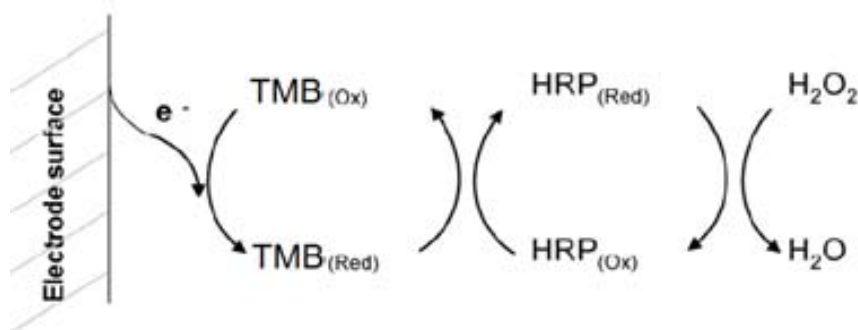


Figura 3.4.: Reducción de H_2O_2 , por el TMB, catalizado por la enzima HRP [30].

Detección con marcadores electroactivos

Los marcadores electroactivos son moléculas que intercambian electrones (es decir, se oxidan y/o reducen) con facilidad y que, óptimamente, muestran un comportamiento electroquímico reversible. Entre los marcadores electroactivos más empleados destacan los derivados del ferroceno y el azul de metileno [31]. Una característica de este tipo de moléculas es que su comportamiento electroquímico varía diferencialmente cuando son modificadas y/o inmovilizadas de distinta forma. Es decir, que diferentes variantes de un mismo marcador se oxidan/reducen a diferente potencial, generando picos diferentes. Así mismo, diferentes marcadores generan patrones identificables. Gracias a esto la utilización de marcadores electroactivos permite la detección de varios analitos simultáneamente. Por ejemplo, Wu et al. [32] utilizaron los marcadores “neutral red” y tionina para la detección simultánea de dos marcadores de cáncer cervical. En este trabajo, en que cada anticuerpo de detección se había conjugado con uno de los dos marcadores electroactivos, el “neutral red” y la tionina generaron picos de oxidación/reducción a distintos potenciales. Por tanto en la voltametría final pudieron analizarse los dos picos independientemente, la altura de las cuales estaba directamente correlacionada con la cantidad del antígeno respectivo presente en la muestra. En otro ejemplo Zhu y colaboradores llegaron a detectar cuatro analitos en paralelo sobre un mismo sensor empleando cuatro marcadores electroactivos diferentes [33].

Detección mediante nanopartículas metálicas o semiconductoras

Se ha demostrado que las nanopartículas (NPs) metálicas, como las NPs de oro (AuNPs) y las NPs semiconductoras o “quantum dots” (QDs), pueden catalizar algunas reacciones electroquímicas, comportándose como miméticos enzimáticos. Por

otra parte, este tipo de nanoestructuras también pueden utilizarse como marcadores por sí mismas ya que al ser disueltas en medio ácido liberan cantidades ingentes de iones, que pueden ser entonces detectados electroquímicamente [34, 35]. Un ejemplo especial es la utilización de AuNP como marcador en inmunosensores electroquímicos, acoplada a la amplificación de señal mediante la reducción de AuCl_4^- catalizada por las propias AuNPs y detectada por técnicas voltamétricas como la voltametría de onda cuadrada [36, 37]. Independientemente de la estrategia de detección empleada, se ha defendido que NPs y QDs son estables en un rango de condiciones más amplio que los marcadores enzimáticos, que pueden sufrir desnaturalización y/o inactivación por efecto de inhibidores o cambios en la temperatura, pH o salinidad del medio, y pueden producir niveles de señal cuanto menos comparables y a menudo superiores.

Del mismo modo, las NPs semiconductoras también se pueden detectar electroquímicamente [38]. Además, se pueden producir NPs semiconductoras de diversos materiales (ZnS, CdS, PbS, CuS) que se pueden utilizar en paralelo como marcadores, ofreciendo la posibilidad de realizar ensayos multiplexados de varios analitos simultáneamente [39, 40, 41].

3.1.1.5. Inmunosensores de detección directa de la interacción antígeno-anticuerpo sin marcador

La detección directa de la interacción antígeno-anticuerpo, es decir, sin emplear marcadores de ningún tipo, se realiza mayoritariamente mediante métodos impedimétricos [42]. El uso de la impedancia/capacitancia para la detección de esta interacción, se presentó por primera vez en 1988 [43]. Como se demostró, la formación del complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del electrodo producía un aumento del grosor de la capa dieléctrica, lo que conllevaba cambios en la capacitancia proporcionales al tamaño y a la concentración de antígenos.

Los cambios que ocurren entre la superficie del electrodo y la solución que le rodea, después de la unión de un antígeno o anticuerpo, se pueden estudiar analizando el valor de la impedancia medida en función de la frecuencia de la señal aplicada. El análisis de la señal se hace a menudo representando la componente real de la impedancia versus de la imaginaria en lo que se conoce como un gráfico de Nyquist. Hay varias teorías que explican cómo la unión de estas moléculas afecta a cambios en la componente real e imaginaria de la señal de respuesta del sistema, aunque sea difícil identificar el origen real de estos cambios [44]. Una de las hipótesis se basa en que la unión de antígenos más grandes crea una barrera resistiva que produce un aumento en la impedancia, mientras que para la unión de antígenos más pequeños la carga superficial de los mismos (positiva o negativa) puede facilitar o dificultar la transferencia de carga y disminuir o aumentar la impedancia, respectivamente [45]. Sin embargo muchos autores se centran en medir la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), en vez de analizar las componentes real e imaginaria de la impedancia [46, 47, 48]. La R_{ct} es un parámetro que mide, de manera directa, la facilidad de

transferencia de carga (es decir, la eficiencia de transferencia de electrones) que hay entre un electrodo y la solución que le rodea. Este parámetro está directamente relacionado con la concentración de productos de la reacción que hay en el sistema y las propiedades de la superficie del electrodo, permitiendo la detección de cambios en cualquiera de los dos (por ej., captura de moléculas sobre el sensor o consumo/generación de moléculas electroactivas en el medio).

Otro método utilizado para la detección directa de la interacción antígeno-anticuerpo sin marcador son los sensores potenciométricos, como por ejemplo los transistores de efecto campo (FET, del inglés “field effect transistors”) [18, 49].

3.1.2. Sensores electroquímicos de ADN

Los sensores electroquímicos de ADN detectan ácidos nucleicos mediante transductores electroquímicos.

James Watson y Francis Crick propusieron la estructura en doble hélice del ADN en 1953 y 9 años más tarde ganaron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por resolver uno de los enigmas más importantes de la biología (Figura 3.5). Según este modelo el ADN es un largo polímero formado por 2 cadenas de nucleótidos apareadas por complementariedad de bases, en que las 2 hebras de ADN se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre los pares de bases. La clave es que estas interacciones no ocurren indistintamente entre las 4 bases nitrogenadas existentes en el ADN, sino únicamente entre adenina (A) y timina (T) y entre guanina (G) y citosina (C). Esta es una de las propiedades que permite al ADN ser la molécula de almacenamiento de la información genética y el responsable de la transmisión hereditaria de la misma.

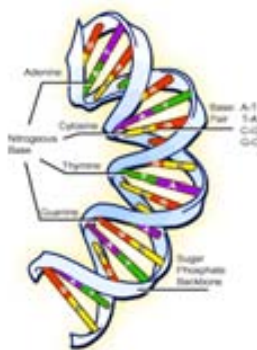


Figura 3.5.: Estructura de doble hélice del ADN.

El ADN es una molécula que, debido a su estructura, es fácil de adaptar a aplicaciones de biosensado [50]. Las interacciones de pares de base que se constituyen mediante secuencias complementarias en la doble hebra de ADN (dhADN) son específicas y robustas. De entrada, las sondas de ADN son fáciles de producir por

síntesis química y de modificar para incluir, por ejemplo, marcadores (electroactivos o fluorescentes), grupos activos (para su posterior autoensamblado o conjugación) o moléculas de captura (como la biotina). Por tanto, utilizando protocolos y espaciadores apropiados, la inmovilización de una sonda de ADN sobre un transductor electroquímico puede resultar más fácil que la de un anticuerpo y tener un menor efecto sobre su integridad y eficiencia [51]. Finalmente las interacciones que se forman entre los pares de bases de las secuencias complementarias en la doble hebra de ADN (dhADN) son específicas y robustas, lo que convierte a los sensores de ADN en dispositivos altamente eficientes y específicos [52, 53].

En la configuración más común de un sensor de ADN electroquímico, una hebra simple de ADN (hebra de captura o sonda) se inmoviliza en la superficie del electrodo. Para ello se han descrito numerosas estrategias, como el autoensamblado de sondas modificadas con grupos $-SH$ sobre superficies de oro, la conjugación química de sondas modificadas con grupos $-NH_2$ sobre superficies de diversos materiales modificadas con grupos funcionales apropiados, la captura por afinidad de sondas biotiniladas sobre superficies modificadas con (estrept)avidina, o la utilización de anticuerpos anti-ADN, por citar algunos ejemplos [50, 52, 54]. Cuando posteriormente ocurre la hibridación con la hebra complementaria sobre la superficie del sensor, esta se detecta electroquímicamente. Sin embargo en esta sección se hará énfasis en los formatos de detección de ADN en solución, en que la hibridación entre diana y sonda ocurre sin que esta última haya sido inmovilizada sobre el transductor, que ha sido la estrategia que se ha empleado en esta tesis (Capítulo 5).

Como en el caso de los inmunosensores, la detección electroquímica de la señal de hibridación se puede obtener mediante el uso de marcadores o por transducción directa sin marcador. Mientras las técnicas basadas en el marcado utilizan marcadores enzimáticos, NPs/QDs y marcadores electroactivos [51], en las técnicas sin marcado se detectan directamente cambios físicos en el sistema tras la hibridación [44]. La ventaja principal de la detección con marcado es su sensibilidad y la principal desventaja es que requiere el marcado de una sonda de ADN y/o más pasos en el ensayo electroquímico. De nuevo, en esta sección se incidirá en la utilización de moléculas electroactivas como marcador para la detección de ADN pues ha sido la aproximación explotada en el trabajo que se resume en el Capítulo 5.

3.1.2.1. Detección electroquímica de ADN sin marcador

Algunos métodos de detección de ADN se basan en la detección directa de la hibridación entre sonda y diana molecular por técnicas voltamétricas o impedimétricas. Estas estrategias se apoyan, principalmente, o en la detección de cambios físicos asociados con la reacción de hibridación, ya que en promedio el ADN está cargado negativamente, o en la electroactividad intrínseca de la molécula de ADN. Los cambios físicos que se analizan son, al igual que en los inmunosensores electroquímicos, cambios en la resistencia y conductividad de la interfaz, que permiten diferenciar

cuando el transductor exhibe en superficie la doble hebra (dhADN, híbrido sonda-diana) o la hebra de cadena simple de ADN (shADN, solamente sonda) [55, 56].

Por su parte, las señales intrínsecas de los ácidos nucleicos se pueden obtener mediante la oxidación de la guanina [57]. Para ello, es habitual modificar las bases guanina de la hebra de captura para obtener bases ionosina, que también se unen a la citosina por complementariedad de bases, pero se oxidan a un potencial diferente al de la guanina. Por lo tanto, el pico de oxidación atribuible a la guanina en el ensayo puede asignarse a las guaninas de la hebra de ADN que se ha capturado, sin interferencia por parte de la sonda (Figura 3.6.a).

Con el objetivo de amplificar las señales de oxidación de la guanina, se puede acoplar la oxidación de la misma a un ciclo electrocatalítico en presencia de un mediador de redox como el $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ (Figura 3.6.b). En este caso, tras la hibridación se aplica un potencial de oxidación al electrodo que genera $[Ru(bipy)_3]^{3+}$, que será reducido de nuevo a $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ por la acción catalizadora de las guaninas de la hebra de ADN capturada [52].

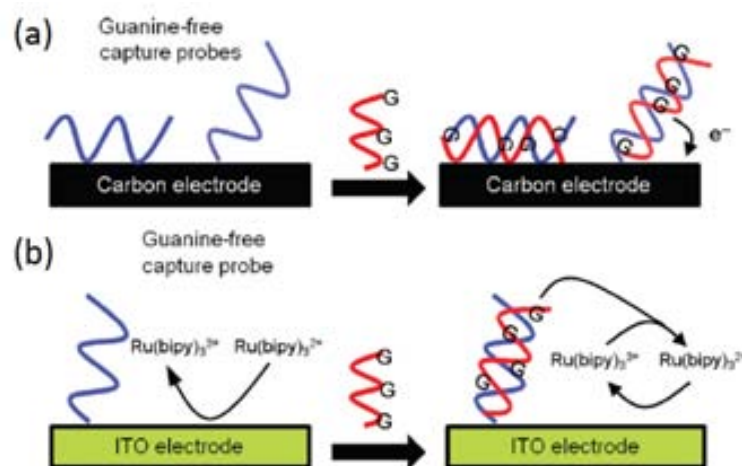


Figura 3.6.: Representación esquemática de detección electroquímica de ADN sin marcador mediante la modificación de la hebra de captura con ionosina (hebra sin guanina en la imagen) y (a) detección directa de la oxidación de guanina o (b) amplificación de la señal de guanina con un mediador redox $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ [52].

En general, los métodos sin marcaje tienen la ventaja de ser más simples y tener un bajo coste, pero normalmente son poco sensibles. Por ello, y debido a la baja electroactividad de la guanina, los métodos con marcador son más utilizados.

3.1.2.2. Detección electroquímica del ADN usando agentes intercalantes como marcador electroactivo

Unos de los marcadores de ADN más utilizados son los agentes intercalantes. Los agentes intercalantes de ADN son en general moléculas orgánicas pequeñas, que

desestabilizan o desenrollan las hebras del ADN al encajarse entre dos pares de bases mediante enlaces π , lo que los convierte en mutágenos potenciales. Muchos intercalantes presentan también propiedades colorimétricas, fluorescentes y/o electroquímicas. Por este motivo pueden emplearse para detectar el ADN sin necesidad de incorporarlos químicamente a la hebra de captura. Los intercalantes electroactivos más utilizados han sido resumidos en la Tabla 3.1 y se describen brevemente en las siguientes secciones.

Intercalador	Potencial redox	Referencias
Azul de Metileno (MB)	-0.186 V vs Ag/AgCl	[58, 59, 60, 61, 62, 63]
Hoeschst 33258	0.55 V vs Ag/AgCl	[64, 65, 66, 67, 68]
Daunomicina	0.5 V vs Ag/AgCl	[69, 70]
Ácidos de Antraquinona	-0.505 V vs Ag/AgCl	[71, 72]
Azul de Meldola (MDB)	-0.2 V vs Ag/AgCl	[73, 74]
Complejos de Osmio	de 0.175 V a 0.848 V vs Ag/AgCl	[75, 76, 77]

Tabla 3.1.: Intercaladores redox de ADN.

Azul de Metileno (MB)

El MB (del inglés “Methylene Blue”), es uno de los intercalantes que más se utiliza y se caracteriza por mostrar diferente afinidad por la hebra simple y la hebra doble de ADN. La reacción redox del MB en solución se muestra en la Ecuación 3.1. En ella, participan 2 electrones y se genera la forma reducida del MB, el azul de leucometileno (LB).



Hay varias estrategias que utilizan el MB como discriminador de la hebra simple y doble de ADN. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos tienen que ser analizados dependiendo de la configuración del ADN y de las condiciones experimentales. En la Figura 3.7 se muestran como ejemplo 3 configuraciones de ensayo diferentes, en que se han usado diversas estrategias de inmovilización de la sonda de ADN sobre la superficie del sensor y/o diferentes tipos moleculares de sonda. En el primer caso la hebra de captura ha sido incorporada mediante inmovilización dirigida y queda empaquetada perpendicularmente a la superficie del sensor (Figura 3.7.a). Como la hebra simple del ADN es más flexible que la doble hebra, sufre torsiones que ponen en contacto las moléculas de MB intercaladas con la superficie del sensor; cuando ocurre la hibridación y se forma una doble hebra más rígida, la señal del MB disminuye porque el MB se aleja de la superficie del electrodo. En el segundo caso se han empleado sondas de ADN que han sido inmovilizadas sobre la superficie por atracciones electrostáticas, de forma que quedan “recostadas” horizontalmente sobre la superficie del electrodo (Figura 3.7.b). Cuando ocurre la hibridación el MB

tiene menos accesibilidad al ADN y, por lo tanto, la señal de MB también disminuye. El tercer caso muestra una sonda en horquilla “hairpin” que se caracteriza por una estructura mixta de cadena simple/doble (Figura 3.7.c). En este caso concreto los cambios en señal producidos por la hibridación dependerán de la largura y de la composición de la secuencia del ADN con configuración de horquilla que se utiliza.

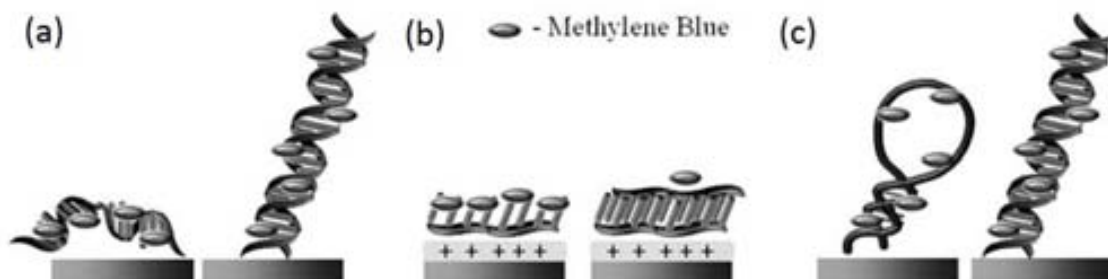


Figura 3.7.: Distintas configuraciones y condiciones experimentales del ADN, que modifican la interacción del ADN con el MB, y el análisis de las señales electroquímicas del MB [78].

La detección de ADN también se puede realizar sin una inmovilización previa del ADN a la superficie del electrodo, una estrategia extremadamente fácil de llevar a cabo y que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra [60, 79]. En este caso, la hebra simple de ADN se encuentra en solución y la hibridación con la hebra complementaria sucede en la solución misma en presencia del MB. En este contexto, el MB se intercalará en la dhADN que se haya formado, disminuyendo la cantidad de MB libre en solución. Por lo tanto, si comparamos el pico de reducción del MB generado por una solución sin dhADN con los picos generados por soluciones con concentraciones crecientes de dhADN, y analizamos el porcentaje de disminución del pico del MB a medida que la concentración de dhADN aumenta, seremos capaces de cuantificar la cantidad de dhADN presente en la muestra [60].

Hoechst 33258

Los Hoechst forman una familia de colorantes fluorescentes, de entre los cuales el Hoechst 33258 también se puede utilizar como intercalante electroactivo. Como ocurre con el MB, la interacción del Hoechst 33258 con el ADN genera una disminución de la señal voltamétrica del Hoechst 33258 libre en solución [66].

También en este caso hay 2 estrategias de detección posibles: una en la que se inmoviliza el ADN y la otra libre de inmovilización. Por ejemplo, Kobayashi et al. describen una estrategia sin inmovilización, en la que se miden la disminución de la señal voltamétrica del Hoechst, que se deriva de la unión del Hoechst al ADN en proporción a la cantidad de ADN en un rango de 1.5 a 25 mg L^{-1} [66]. En este caso, en vez de utilizar un intercalador para discriminar la hebra simple de la hebra doble, se utiliza para cuantificar la cantidad de ADN que hay en la muestra (Figura 3.8). Por otro lado, Zhao et al. [68] fabricaron sensores microfluídicos de

ADN para detectar secuencias específicas del ADN, ya que el Hoechst 33258 tiene una mayor afinidad por la dhADN que por la shADN.

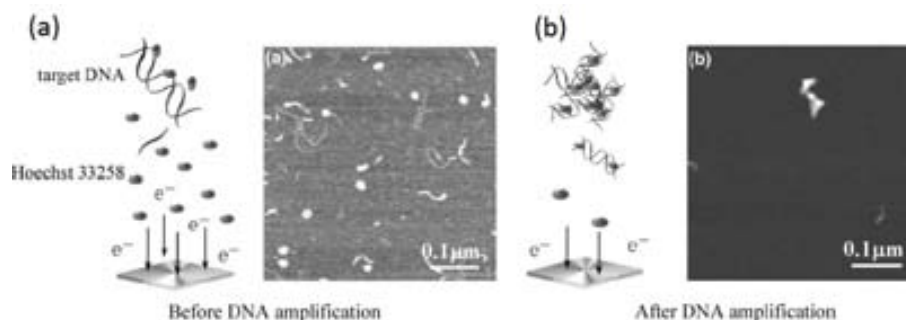


Figura 3.8.: Detección electroquímica de ADN mediante Hoechst 33258. (a) Antes de la PCR las moléculas de Hoechst presentes en la solución pueden difundir libremente hacia la superficie del electrodo. (b) Tras la PCR, el Hoechst se intercala en el ADN y la difusión de las partículas de Hoechst al electrodo disminuye [66].

Acidos de Antraquinona

Wong et al. utilizaron el ácido de antraquinonamonosulfónico (AQMS) y el ácido de antraquinona 2,6-disulfónico (AQDS) como intercalantes para un biosensor electroquímico de ADN, cuya estrategia de transducción se basaba en la transferencia de carga a lo largo de la cadena de ADN [71, 72]. Delaney et al. ya habían demostrado que los enlaces entre los pares de bases de la dhADN eran responsables de la transferencia de carga que ocurre a lo largo de la cadena de ADN [80]. El acoplamiento de los pares de bases depende de una química sensible y de la estructura y dinámica de la secuencia de ADN. Por lo tanto, dependiendo de si la shADN ha hibridado o no con su hebra complementaria, la transferencia de carga a lo largo de esta cadena cambiará.

En su trabajo, Wong et al. modificaron la superficie de un electrodo de oro con la shADN y realizaron una incubación con AQDS [71, 72]. Según demostraron, en este caso no se mide ningún pico porque no hay transferencia eficiente de electrones a lo largo de la shADN. Sin embargo, cuando el ADN hibrida con la hebra complementaria, se observan picos correspondientes a la oxidación y reducción del AQDS.

Complejos de Osmio

Maruyama et al. describieron el complejo metálico $(Os(DA - bpy)_2DPPZ)^{2+}$ que mostraba una gran afinidad por el ADN [76]. Hoy en día se sabe que los complejos de $Os(VIII)$ se pueden intercalar tanto en el ADN como en el ARN, preferentemente de doble hebra.

Deféver et al. presentaron una estrategia para la detección electroquímica del ADN en solución, basada en la monitorización electroquímica de un complejo de osmio que actuaba como intercalante [77]. En esta configuración, los autores suplementaban la muestra de shADN que querían detectar con un complejo de osmio, el

$Os((bpy)_2DPPZ)^{2+}$. Cuando se añadía la hebra complementaria a la muestra, parte del complejo de osmio se intercalaba en la dhADN y la señal voltamétrica generada por el $Os((bpy)_2DPPZ)^{2+}$ libre en solución disminuía.

3.1.2.3. Detección electroquímica del ADN usando marcadores electroactivos enlazados covalentemente

En contraste a los agentes intercalantes, que se unen al ADN de forma reversible e inespecífica, los marcadores enlazados covalentemente proporcionan una estabilidad y fiabilidad mayor [52]. En este caso, el marcador se puede unir covalentemente a la shADN de captura, para lo que se han descrito un buen número de estrategias químicas [31]. De entre los marcadores electroactivos empleados más habitualmente para este fin destacan el MB, que ya ha sido descrito en la sección anterior, y los derivados del ferroceno (Fc).

El ferroceno es un compuesto organometálico con fórmula $Fe(C_5H_5)_2$ que fue descubierto a principios de 1950. En electroquímica resulta muy útil porque se oxida a potenciales bajos ($Fe^+ / Fe = 0.5 \text{ V vs SCE}$). Además se conoce un número considerable de derivados del ferroceno que son relativamente fáciles de sintetizar, que se pueden incorporar a los oligonucleótidos durante su proceso de síntesis en laboratorios de química orgánica o tras la misma y que presentan comportamiento electroquímico distinguible entre sí (es decir, oxidación y reducción a diferentes potenciales) [31].

En la producción de sensores electroquímicos de ADN, a menudo se conjuga el ferroceno a ácidos péptido nucleicos (Fc-APN) en lugar de usar sondas de ADN. El APN es un polímero similar al ADN y al ARN, pero sintetizado artificialmente de forma que no contenga grupos fosfato cargados negativamente [81]. Un cierto número de ejemplos de detección de ADN se fundamentan en esta propiedad del APN [82, 83, 84, 85, 86]. Por ejemplo, en la configuración propuesta por Luo et al., la detección libre de inmovilización de ADN se realiza usando como hebra de captura un Fc-APN neutro y un electrodo de ITO cargado negativamente [82, 83, 86]. En esta configuración la hebra simple de Fc-APN está en solución y, si no se hibrida con su hebra complementaria de ADN, difundirá hacia la superficie del electrodo (cargado negativamente) detectándose el pico de oxidación generado por el Fc. Sin embargo, si el Fc-APN se hibrida con su hebra complementaria de ADN, que presenta grupos fosfato cargados negativamente, el híbrido Fc-APN-ADN será repelido del electrodo y el Fc no se oxidará (Figura 3.9).

Sin embargo la mayoría de los grupos utilizan sondas “clásicas” de ADN en vez de utilizar el APN; es decir, utilizan una hebra corta de ADN marcada con Fc que es complementaria a un fragmento de la secuencia del ADN que se quiere detectar [87]. En este trabajo concreto, cuando la hebra Fc-ADN se une a su hebra complementaria, se incubaba la muestra con una exonucleasa específica que libera el nucleótido terminal de la sonda de ADN, que es el que se ha marcado con ferroceno. De esta

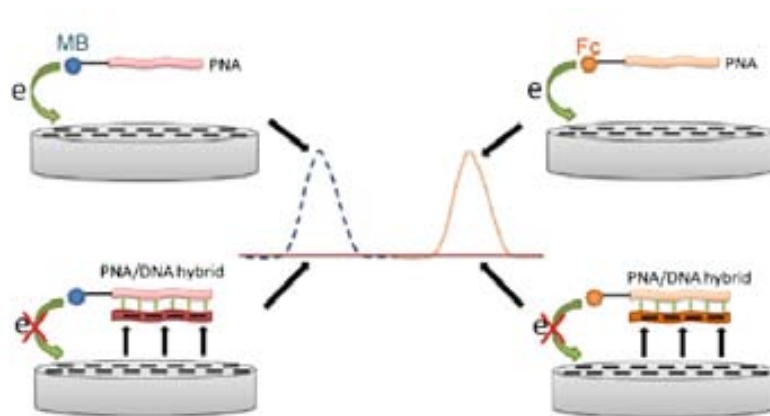


Figura 3.9.: Esquema que muestra la detección electroquímica de ADN sin inmovilización con PNA marcado electroquímicamente. A la izquierda el marcador electroquímico es el MB y a la derecha Fc [86].

forma el mononucleótido-Fc puede difundir hacia el electrodo con más facilidad y el Fc se detecta eficientemente en la superficie de un electrodo serigrafado [87].

La configuración utilizada por [86] y [87] permite la detección multianalítica. En [86], aparte de la secuencia de APN modificada con Fc, se añade una segunda sonda de APN modificada con azul de metileno (MB) (Figura 3.9). Como el potencial de reducción del MB es de $-0,55\text{ V vs Pt}$ y el potencial de oxidación del Fc es de $+0,2\text{ V vs Pt}$, las señales voltamétricas de estos dos marcadores no interfieren entre sí y pueden ser distinguidas en el electrodo empleado por los autores. En [87] se utilizan los marcadores electroactivos metalocenoilo y ferrocenoilo para la detección multianalítica.

3.1.2.4. Detección electroquímica de productos de la PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa), descrita por Mullis en 1985, permite realizar una detección de ácidos nucleicos muy sensible y específica. Este descubrimiento revolucionó el campo de la biología molecular y gracias a él Mullis recibió el Premio Nobel de Química en 1993.

El método de la PCR se basa en la amplificación de fragmentos de ADN de secuencia conocida empleando dos segmentos de ADN o cebadores complementarios a los extremos de la secuencia que se quiere amplificar y una enzima polimerasa termoestable [88] (Figura 3.10). Para ello, primero se desnaturaliza el ADN de la muestra sometiéndolo a una temperatura por encima del punto de fusión de la dhADN (normalmente a $T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$), lo cual separa las dos hebras de ADN y genera cadenas sencillas del mismo. A continuación se baja la temperatura ($T = 40\text{-}68\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se produce la hibridación de los cebadores. Es decir, cada cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN de cadena sencilla de la muestra, que actuará como

molde a partir de ahora. Luego se produce la extensión de la secuencia complementaria desde el cebador por parte de la polimerasa ($T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esto da fin al primer ciclo de la PCR, en que se obtienen dos copias de la secuencia diana por cada copia existente en la muestra originalmente. Por lo tanto el ciclado repetitivo alternando estas temperaturas y funciones, genera un aumento exponencial en el número de copias de la secuencia específica de ADN.

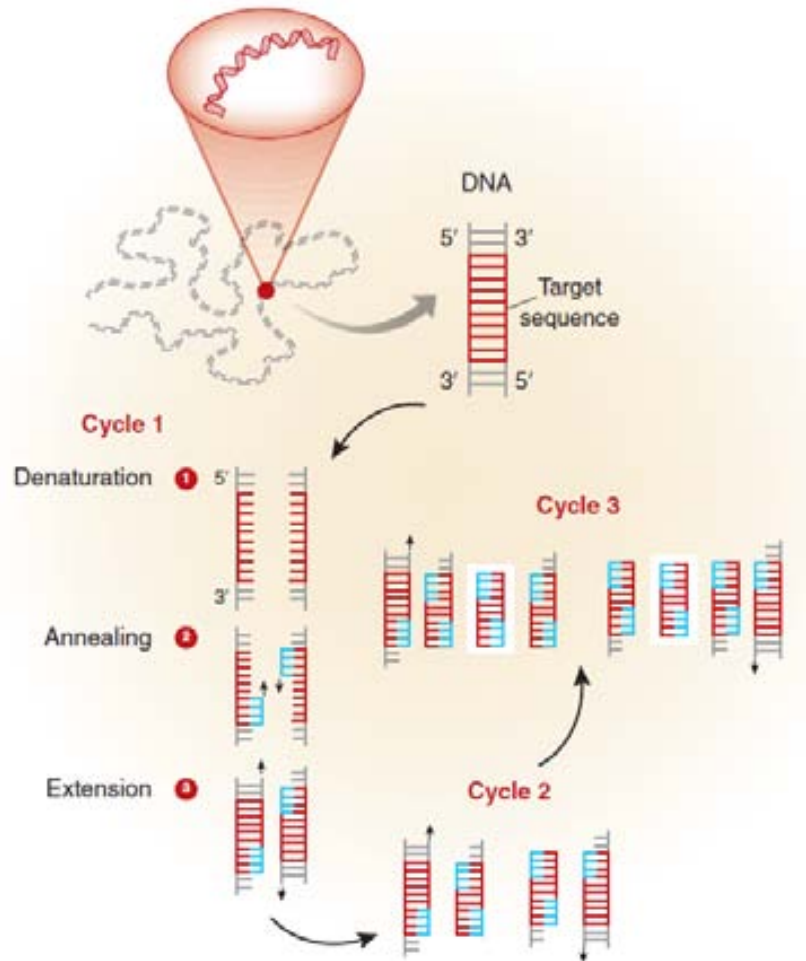


Figura 3.10.: Representación esquemática del proceso de PCR: (1) desnaturalización, (2) hibridación de los cebadores, (3) extensión [89].

Debido a su gran especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y amplio rango dinámico, la PCR se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para el análisis de ácidos nucleicos. Es por ello que muchos equipos han avanzado en el desarrollo de sistemas miniaturizados e integrados de detección de ADN tras su amplificación por PCR [90]. Desde el lanzamiento del primer chip de PCR, todo tipo de tecnologías microfluídicas han sido aplicadas exitosamente a la mejora de la amplificación de ADN por PCR [91]. Estas aproximaciones han producido en general resultados más rápidos, debido a capacitancias térmicas más pequeñas y transferencias de calor

más rápidas entre los componentes de la PCR y los componentes que controlan la temperatura en este tipo de dispositivos integrados. Entre los numerosos ejemplos disponibles, Belgrader et al. desarrollaron en 1998 un instrumento portátil, rápido y reutilizable para la PCR, que monitorizaba de manera continua agentes biológicos infecciosos [92].

Los materiales más utilizados en la fabricación de microchips de PCR son el silicio [93, 94] y el vidrio [95]. Las ventajas del silicio son su buena conductividad térmica y la existencia de métodos de microfabricación ampliamente conocidos y estandarizados. Sin embargo, el silicio no es transparente, lo que dificulta la inspección de los dispositivos a simple vista y la integración de formatos de transducción espectrofotométrica. El vidrio es ópticamente transparente y eléctricamente no conductor, pero su implementación en los procesos de microfabricación ha sido menor y no está por tanto totalmente optimizada. Es por estos motivos que hoy en día muchos trabajos exploran la utilización de materiales alternativos. Debido a su bajo coste y biocompatibilidad actualmente se están utilizando mucho para este tipo de aplicaciones los materiales plásticos, como por ejemplo la poliimida, el policarbonato, el olefín polímero (COP) y copolímero cíclico (COC) [96] y el PDMS [97].

Si se acopla la detección electroquímica a la PCR, se puede conseguir una gran sensibilidad en los sensores de ADN [77, 98]. Si bien un elevado número de artículos científicos describen sensores de ADN sin la implementación de amplificación de ningún tipo, la detección de secuencias únicas y específicas de ADN humano es muy complicada sin que se haya amplificado el ADN previamente. Los recientes avances en las tecnología de microfabricación han posibilitado la integración de la amplificación y la detección de la muestra en dispositivos de tipo Lab On a Chip (LOC). Estos dispositivos analíticos integrados permiten la automatización completa del proceso, disminuyendo además la posibilidad de contaminación de la muestra, una complicación que ocurre con mayor frecuencia durante el procesado manual (Sección 3.3).

En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para construir dispositivos LOC, como plataformas para investigaciones genéticas, proteómicas, forenses, etc. Aunque ha habido grandes avances en la miniaturización del sistema de PCR, los avances en la miniaturización de los mecanismos o dispositivos de medida integrados han sido limitados. Hasta ahora, la mayoría de los dispositivos integrados se basaban en la detección óptica [99, 100, 101]. Sin embargo, los detectores ópticos son caros y difíciles de miniaturizar. Los métodos electroquímicos parecen más interesantes, ya que permiten la rápida detección con un bajo coste y requieren de un equipamiento de menor tamaño y de baja potencia. Además, el desarrollo de dispositivos Point Of Care (POC) ha permitido el análisis portable, acercando los tests de ADN al paciente. El reducido coste de estos dispositivos sugiere que su implementación podría facilitar y mejorar el control sanitario y medioambiental a nivel global, incluido el tercer mundo.

Hay dos métodos fundamentales para la detección electroquímica del ADN ampli-

ficado por PCR: la detección electroquímica al final del proceso de la PCR y la detección electroquímica en tiempo real a lo largo del mismo. En los métodos de detección al final del proceso de PCR, la detección se desarrolla como se ha descrito en el apartado anterior, con marcador o sin marcador electroactivo y con ADN inmovilizado o sin inmovilizar. La detección electroquímica en tiempo real de amplicones de la PCR es un método de medidas cuantitativas del número de copias iniciales del ADN analito [90, 102].

3.2. Nanomateriales y micromateriales en la producción de biosensores mejorados

Los avances de la nanotecnología en los últimos años han sido muy rápidos, gracias en parte al amplio estudio que se ha realizado en campos como la fabricación y propiedades de los nanomateriales. Se puede decir que el comienzo del desarrollo de la nanociencia vino marcado por la invención del microscopio de barrido de efecto túnel (STM) en 1980 [103]. Sin embargo, 20 años antes, en una reunión de la *American Physical Society*, Richard Feynman había especulado con la posibilidad de poder manipular directamente átomos individuales en un curso titulado “There is plenty of room at the bottom”, avanzando el potencial de la nanotecnología.

La nanociencia es la ciencia que se encarga del estudio de las estructuras químicas y biológicas en el rango de dimensiones nanométricas. El progreso continuo en la síntesis y control de materiales en escalas submicrométricas y nanométricas ha conllevado la creación de materiales funcionales avanzados, que posibilitan y mejoran la construcción de biosensores electroquímicos y el desarrollo de bioensayos electroquímicos. Esto es debido a que las propiedades de los materiales a escala nanométrica son diferentes a las propiedades que tienen los materiales a escala macroscópica. Por ejemplo, cuando el tamaño de las partículas disminuye, el ratio superficie/volumen aumenta. Este hecho, causa la modificación de las propiedades térmicas, eléctricas, ópticas, mecánicas y biológicas. Aparte del tamaño, la morfología de una nanoestructura también es muy importante. Se ha demostrado que parámetros como la forma, tamaño, diámetro, características de la superficie, estructura cristalina, composición química u orientación cristalográfica a lo largo del eje de una partícula o estructura nanométrica son factores a tener en cuenta a la hora de evaluar su comportamiento [104].

Se ha investigado mucho en el desarrollo y fabricación de sensores nanoestructurados y transductores innovadores. Debido a los avances realizados en el campo de los nanomateriales, los sensores electroquímicos han ganado en sensibilidad alcanzando el nivel de los sensores ópticos más avanzados [105]. En los sensores electroquímicos los nanomateriales y micromateriales, como nanopartículas de oro, micropartículas magnéticas y nanotubos de carbono [106], se emplean debido a sus propiedades especiales para mejorar la sensibilidad de los ensayos. La mejora en la sensibilidad se debe a muchos factores. Por una parte, la inmovilización de las biomoléculas sobre nanopartículas parece mejorar su estabilidad respecto a la incorporación sobre superficies macroscópicas. Por otra parte, a nivel de la detección electroquímica los nanomateriales son utilizados principalmente para conseguir el conexionado directo de las enzimas con la superficie del electrodo, para catalizar reacciones electroquímicas actuando como marcadores no-enzimáticos, para mejorar la captura del analito y para producir amplificación de las señales de los eventos de bioreconocimiento [107]. Como ejemplo, en la Figura 3.11 se pueden ver distintas estrategias de amplificación de señal mediante el uso de nanomateriales en sensores electroquímicos de ADN: NPs

de oro y platino, NTC, NPMs, grafeno y QDs.

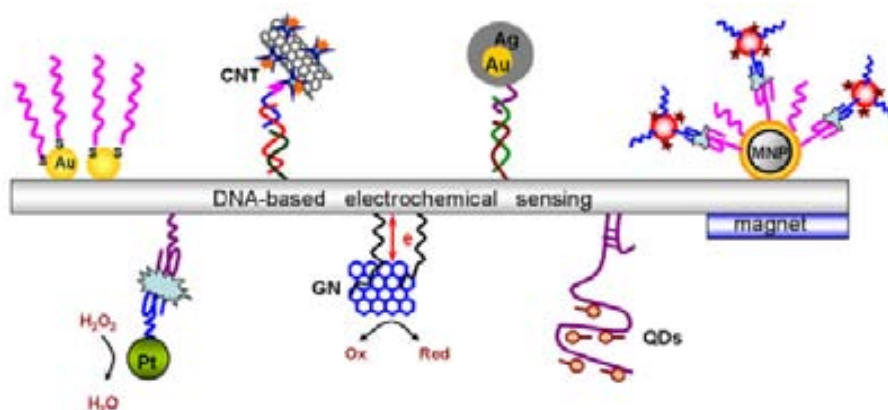


Figura 3.11.: Ilustración esquemática de distintas estrategias de amplificación de señal mediante nanomateriales en sensores electroquímicos de ADN [107].

A continuación se incidirá en la utilización de micropartículas magnéticas y NTC en la producción de biosensores electroquímicos, pues han sido los materiales utilizados en este trabajo.

3.2.1. Micropartículas magnéticas y la producción de magneto - biosensores

Las micropartículas magnéticas (PMs) son una potente y versátil herramienta de diagnóstico en biología y medicina. Entre sus características destacan el que las PMs tienen una gran área superficial por unidad de volumen, una buena estabilidad y, al ser incubadas en agitación o rotación con las muestras, mejoran la cinética de las reacciones. En este contexto, las PMs se utilizan para la separación magnética de las dianas moleculares del resto de componentes de una muestra, tras lo cual se las puede confinar sobre o junto a un electrodo para la detección electroquímica del ensayo. Para ello se emplean PMs paramagnéticas, es decir, que solo muestran comportamiento magnético cuando están bajo el efecto de un campo magnético (por ejemplo, en la proximidad de un imán).

En la mayoría de biosensores electroquímicos “clásicos”, el electrodo se modifica con diferentes tipos de anticuerpos, antígenos o shADN. La captura del analito se produce entonces sobre la superficie del sensor lo que, por definición, produce una respuesta extremadamente rápida y sensible. Sin embargo, la utilización de biosensores en muestras complejas puede generar también niveles importantes de adsorción inespecífica de otros componentes de la muestra. Para impedir esto, los protocolos de biofuncionalización de transductores suelen incluir también el recubrimiento con proteínas o polímeros que protejan la superficie de la adsorción inespecífica. A pesar de su eficiencia, este tratamiento puede tener otros efectos adversos, como el

bloqueo físico parcial del sensor e interferencia en la transducción de señal. Se han propuesto varias estrategias para reducir los tiempos de respuesta y los límites de detección (LOD) de los biosensores, incluyendo la modificación de la superficie de los electrodos con nanomateriales o nanoestructuración de los mismos. Estos avances han conllevado la creación de transductores capaces de detectar entidades únicas, como los sensores basados en nanohilos capaces de detectar partículas individuales de virus. Sin embargo, la mayor limitación de los sensores ultrasensibles es el tiempo que necesita el analito para encontrar la superficie sensora y reaccionar con el bioreceptor que porta esta. La mayoría de las soluciones que se plantean a este problema se dirigen a aumentar, por convección, el transporte de masa del analito a la superficie sensora [108]. Otra estrategia para dar una solución a este problema es la utilización de las PMs, donde en vez de que sea el analito el que encuentra el sensor, sea el sensor el que encuentra el analito mediante las PMs funcionalizadas. En este contexto, las PMs se utilizan como “superficies de biocaptura dispersables” y, en algunos casos, incluso como “electrodos dispersables” [109]. Es decir, el analito se captura de la solución usando las PMs y después el compuesto PM-analito se atrae, con la ayuda de un imán, a la superficie del electrodo del sensor electroquímico.

Otra ventaja importante del uso de las PMs en los biosensores electroquímicos es que facilita en gran manera la reutilización de los sensores. Los procesos electrocatalíticos que se producen en el electrodo son en este caso activados y desactivados por las PMs funcionalizadas, en presencia y en ausencia del imán. De esta forma la atracción de las PMs a la superficie del electrodo mediante el imán activa el contacto eléctrico entre la superficie del electrodo y cualquier marcador electroquímico que se haya incorporado sobre las PMs (moléculas electroactivas, enzimas, nanopartículas metálicas); del mismo modo al retirar el imán se desactiva la reacción redox. Lai et al. demostraron que la estrategia de los “electrodos dispersables”, utilizando nanopartículas magnéticas de oro como tal, reducía el LOD de los ensayos hasta 1000 veces [110]. También conseguía una reducción en la duración del ensayo respecto a los ensayos convencionales. Los autores llegaron a la conclusión de que la mejora en el tiempo de detección se debía a que las PMs eran rápidamente atraídas al electrodo por el campo magnético, y que la reducción del LOD se producía porque las PMs detectaban la mayor parte del analito presente en la solución, que luego se concentraba conjuntamente sobre el electrodo.

En los últimos años las PMs se han utilizado ampliamente en plataformas microfluídicas. En 2003 Verpoorte presentó la utilización de esferas magnéticas en microfluídica [111]. Sugería que la utilización de estas esferas podía mejorar, entre otras cosas, las propiedades de transporte por los canales microfluídicos y la capacidad de atrapamiento del analito en muestras de poco volumen.

La comercialización de las partículas magnéticas *Dynabeads* (Invitrogen, Life Technologies) en 1980, supuso un gran avance para la aplicación de las PMs en ensayos electroquímicos. Las *Dynabeads* son esferas superparamagnéticas de poliestireno de tamaño uniforme y con una superficie definida. Hoy en día, se pueden comprar *Dynabeads* de varios tamaños y con superficies modificadas con distintas proteínas y

grupos funcionales.

En las siguientes secciones se analizan los inmunoensayos electroquímicos y los sensores electroquímicos de ADN basados en la utilización de PMs.

3.2.1.1. Inmunosensores electroquímicos con PMs: magneto inmunoensayos y magneto inmuno-sensores

El problema fundamental de los inmunosensores es la falta de reproducibilidad de las superficies inmunosensoras y lo difícil que resulta su regeneración y/o reutilización. Este problema se puede resolver, en gran medida, utilizando PMs desechables funcionalizadas con el anticuerpo para la generación in situ de la superficie inmunosensora. Para ello primero se usan estas PMs inmunofuncionalizadas para capturar el analito de la muestra de manera específica. Después se lavan las PMs para evitar la adsorción inespecífica de moléculas a la superficie de las mismas. Luego se hace el sensado, atrayendo las partículas inmunomagnéticas al electrodo mediante la colocación de un imán debajo de la superficie del mismo. Tras la detección electroquímica, el imán se retira y se limpia el electrodo. De este modo, el electrodo queda preparado para una posterior medida.

La utilización de PMs en los inmunoensayos permite la reducción de los LOD, como se ha comentado anteriormente. El grupo de Alegret describió en 2006 una estrategia de magnetoinmunoensayo electroquímico para la detección de pesticidas en residuos [112]. La reacción inmunológica que ocurría en la superficie de las PMs estaba basada en un ensayo directo competitivo, utilizando la enzima HRP como marcador enzimático. En este trabajo, el LOD que se obtuvo para la detección de atracina era ligeramente inferior al LOD que se conseguía utilizando un inmunoensayo ELISA óptico. Unos años más tarde, en 2011, Laczka et al. mostraron que la detección espectrofotométrica de un ensayo de tipo sándwich llevado a cabo sobre PMs podría detectar la bacteria *E. coli* con un LOD 2 órdenes de magnitud inferior al de un ensayo clásico de ELISA sobre placa empleando los mismos anticuerpos [113]. Este resultado fue mejorado adicionalmente al implementarse la detección electroquímica del marcador HRP empleando un dispositivo de microfluídica. El magneto-inmunoensayo electroquímico podía completarse en menos de 1 hora y tenía un LOD de 55 bacterias mL⁻¹.

3.2.1.2. Sensores electroquímicos de ADN con PMs

Como en el caso de los magneto-inmunosensores, el sensado electroquímico de ADN con PMs permite separar la superficie de atrapamiento de ADN de la superficie de detección de este. De nuevo, la captura o hibridación del ADN diana se lleva a cabo sobre la superficie de las PMs y la detección electroquímica se realiza en la superficie del electrodo. A continuación, se detallan las propiedades que deben cumplir las superficies de atrapamiento y de detección.

Para que una superficie sea adecuada para que ocurra la hibridación, su área debe de ser lo suficientemente grande como para que la captura de ADN sea eficiente y específica. Además, para limitar la adsorción inespecífica de ADN, las sondas de ADN tienen que estar fuertemente unidas a la superficie, lo cual permite la exposición del ADN híbrido a, por ejemplo, cambios de temperatura o lavados astringentes. Finalmente, si la superficie de captura no va a ser empleada directamente como superficie transductora para la detección electroquímica, no es necesario que esta sea conductora; pero es recomendable que sea fácilmente dissociada de la superficie del transductor para que este pueda ser reutilizado.

Una buena superficie de detección, por su parte, tiene que tener un área lo más pequeña posible para poder trabajar con volúmenes reducidos de muestra y reactivos. También, tiene que tener una ventana de potenciales lo suficientemente amplia y apropiada, para que no interfiera en las reacciones que se van a medir.

Teniendo en cuenta los distintos requerimientos que tienen que cumplir las superficies de hibridación y detección, la separación de ambas conlleva una mejora en la detección electroquímica de ADN. Berti et al. presentaron un rápido y sensible ensayo genomagnético ligado a enzimas utilizando un dispositivo microfluídico. Para ello, realizaron la hibridación del ADN en PMs cubiertas de estreptavidina, las cuales habían sido funcionalizadas con una sonda de ADN biotinilada. La secuencia complementaria de ADN hibridaba con la sonda de ADN de las PMs, junto con una segunda sonda de señalización también biotinilada. Tras la captura, las esferas modificadas con conjugados de estreptavidina fosfatasa alcalina se introducían en un dispositivo microfluídico, que incluía 8 canales microfluídicos independientes, y se atrapaban magnéticamente sobre la superficie de los microelectrodos que se encontraban en cada microcanal para la detección electroquímica. Este método permitía la detección de secuencias de ADN en el rango del nM con gran reproducibilidad [114].

Luo et al. [115] utilizaron una estrategia distinta para la detección electroquímica de ADN porque, según señalaron, al atraer las PMs a la superficie del electrodo estas interferían en la transferencia de electrones, lo que dificultaba la obtención de resultados reproducibles. Por este motivo propusieron una estrategia en la que utilizaban el AQMS como marcador electroquímico, el cual tiene mayor afinidad por la dhADN. En este ensayo los autores empezaban por biotinilar la sonda de ADN y recubrir las PMs con estreptavidina, que eran entonces incubadas con el AQMS y la muestra. Si la sonda biotinilada de ADN se hibridaba con su complementaria, el AQMS se unía a la dhADN, que era a su vez atrapado por la PM mediante la unión biotina-estreptavidina. Si la sonda biotinilada de ADN no se hibridaba, la PM solo capturaba esta sonda de hebra sencilla, por la que el AQMS no muestra afinidad. Finalmente, se usaba un imán para concentrar y separar las PM-AQMS-dhADN o las PM-shADN de la solución. Esta solución era la que se medía por DPV en un electrodo. Por lo tanto, la presencia de AQMS en esta DPV significaba que la sonda complementaria de ADN no estaba en la muestra y había sido retirada de la misma con las PMs (Figura 3.12). Analizando las DPV, se observaba una relación casi lineal

entre el pico de corriente medido y el número de copias de ADN patrón, siendo 3×10^4 copias μL^{-1} la concentración mínima detectada.

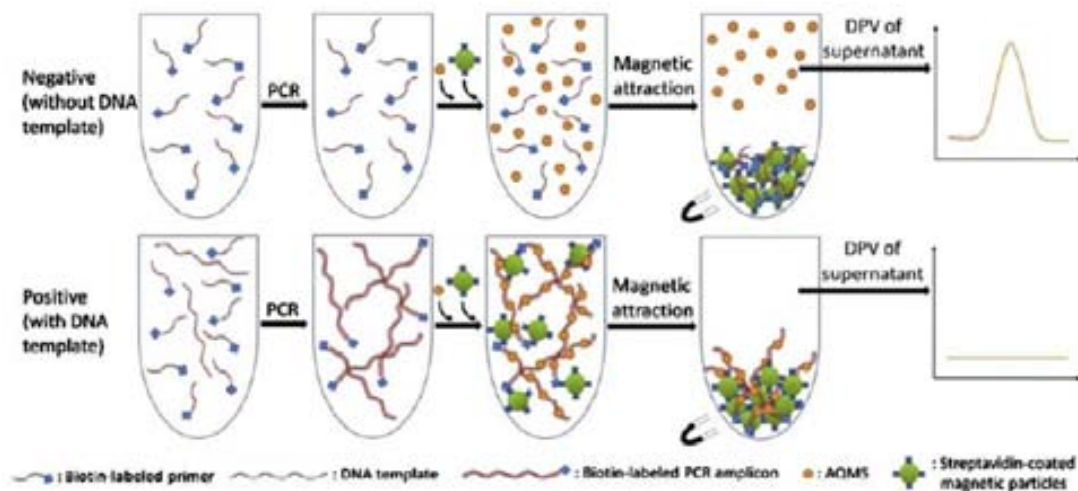


Figura 3.12.: Representación esquemática del proceso de detección electroquímica de ADN mediante PMs según la aproximación propuesta en [115].

3.2.2. Nanotubos de carbono (NTC) y la producción de electrodos nanoestructurados

Los nanotubos de carbono (NTC) fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima. En un artículo publicado en *Nature*, Iijima describió los NTC como microtubos helicoidales de grafito con diámetros de 4-30 nm y longitudes de hasta 1 μm [116]. Más tarde se descubrió que, dependiendo de los parámetros que se utilizasen a la hora de crecer los NTC, estos podían tener una estructura monocapa o multicapa (Figura 3.13). Los nanotubos de carbono monocapa (SWCNT, del inglés “Single Walled Carbon NanoTube”), consisten de una capa de grafito cilíndrica con un diámetro nanométrico (típicamente alrededor de 1 nm). El cierre de los cilindros es el resultado de la inclusión de pentágonos a la red hexagonal de las capas de NTC durante el proceso de crecimiento. Los nanotubos de carbono multicapa (MWCNT, del inglés “Multi Walled Carbon NanoTube”), consisten de varios cilindros concéntricos de estas capas de grafito. Los MWCNT tienen diámetros de 2-100 nm .

Las propiedades especiales de los NTC, derivadas de los enlaces covalentes sp^2 y de la estructura tubular con un gran ratio longitud/diámetro, les convierten en excelentes candidatos para aplicaciones biosensoras [117, 118, 119]. Los NTC tienen muy poco peso, pero disponen de una gran área superficial y pueden soportar una gran fuerza mecánica. Las propiedades conductoras de los NTC son excelentes y se ha demostrado que los NTC tienen una habilidad excepcional para mediar en procesos rápidos de transferencia de electrones en una gran variedad de reacciones. Debido

a la excelente estabilidad química y térmica de los NTC, se los puede funcionalizar químicamente con casi cualquier especie química, lo que conlleva la mejora en la solubilidad y biocompatibilidad de los tubos. Es más, la funcionalización de los NTC puede llegar a ser necesaria si se quieren mejorar las propiedades de los NTC, facilitar la modificación de la superficie de un electrodo con NTC y/o conjugar biomoléculas o marcadores electroquímicos a los mismos. Como la reactividad y conductividad de los NTC está relacionada con el pretratamiento de los nanotubos llevado a cabo antes del ensamblaje a la superficie del electrodo, esta modificación influirá también en el comportamiento electroquímico de los electrodos nanoestructurados.

En general, la funcionalización química de los NTC se puede efectuar de dos maneras: mediante interacción no covalente, es decir por adsorción física o atrapamiento a las paredes de los NTC, y por unión por enlaces covalentes, por ejemplo aprovechando los grupos carboxilados que se crean en los extremos de los NTC cuando se los somete a tratamiento ácido.

En el caso de la funcionalización no covalente de los NTC, la inmovilización de biomoléculas y analitos de pequeño tamaño sobre las paredes de los NTC se origina y estabiliza por una combinación de interacciones electrostáticas, enlaces π - π y/o fuerzas de Van der Waals. Las principales ventajas de este tipo de modificación son que no destruye la estructura sp^2 de los nanotubos y que es fácil de llevar a cabo [120]. La adsorción física o inespecífica se utiliza extensamente para la incorporación de surfactantes, proteínas, péptidos alifáticos y fosfolípidos y resulta muy útil para mejorar las propiedades de dispersión y solubilidad de los NTC [121]. Otro método utilizado es el atrapamiento físico (o “entrapment” en inglés), el cual consiste en atrapar los NTC en un polímero biocompatible, como el *Nan* durante la polimerización del mismo [122]. El atrapamiento de NTC durante la electropolimerización de polímeros se emplea, por ejemplo, para la nanoestructuración de electrodos.

En el caso de la funcionalización covalente de los NTC, destacan dos estrategias: la formación de enlaces amida en los extremos de los NTC utilizando los grupos carboxilados (-COOH) y la incorporación no selectiva de especies muy reactivas a las paredes de los NTC. La primera estrategia se aplica a NTC que han sido sometidos a tratamiento ácido. La exposición de los NTC, que son originalmente muy hidrofóbicos, a una solución de ácido concentrado (normalmente nítrico, sulfúrico, clorhídrico o una mezcla de ellos) se utiliza para eliminar impurezas y contaminantes, pero genera también roturas en los extremos de los tubos y oxidación de enlaces a lo largo de los mismos. Como resultado se obtienen NTC fragmentados de menor tamaño que los originales, que exhiben en los extremos y paredes grupos oxigenados (especialmente grupos carboxilados, -COOH) que aportan un carácter más hidrofílico a los NTC [120, 123]. Los grupos carboxilados resultantes pueden ser empleados para la incorporación de moléculas que tengan grupos amino (-NH₂) libres. Esto se hace mediante la formación de enlaces éster o amida, empleando a menudo reactivos como el EDC/NHS. Alternativamente se pueden llevar a cabo reacciones de adición y sustitución para la incorporación de grupos reactivos a las paredes de los NTC, atacando directamente los orbitales p del esqueleto carbonatado de los

NTC. Este tipo de reacciones se suelen llevar a cabo a elevadas temperaturas en presencia de especies altamente reactivas y uno de los ejemplos más característicos es el tratamiento por plasma [123].

De este modo, la funcionalización de los NTC puede ayudar a mejorar las propiedades de los NTC y facilitar la modificación de la superficie del electrodo con estos. Sin embargo, la incorporación de NTC a un electrodo a partir de suspensiones de los mismos produce resultados muy variables, en que los NTC quedan orientados de forma aleatoria y muestran comportamiento poco reproducible. Otra posibilidad para modificar la superficie del electrodo con NTC, es crecer los NTC directamente desde la superficie [124]. Se ha observado que las técnicas de descarga de arco y ablación con laser permiten la obtención de NTC entrelazados entre sí y mezclados aleatoriamente con varias impurezas. Sin embargo, la técnica de deposición química de vapor (CVD) permite la obtención de NTC alineados y ordenados en la superficie del electrodo [125].

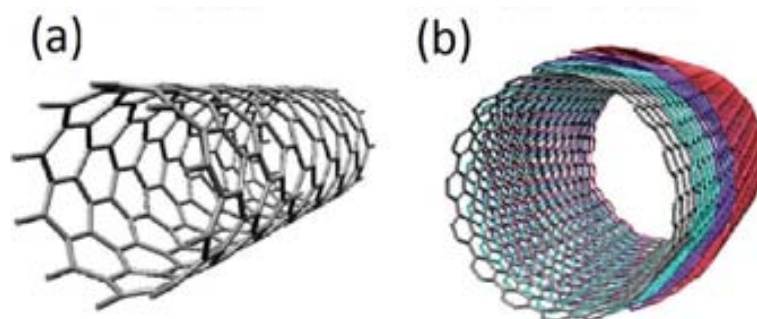


Figura 3.13.: (a) Nanotubo de carbono monocapa (SWCNT). (b) Nanotubo de carbono multicapa (MWCNT).

3.2.2.1. Propiedades de los NTC para la producción de electrodos mejorados

Debido a la estructura de los NTC, existen dos regiones superficiales con distintas propiedades: la pared y los extremos del tubo (Figura 3.14.a). Por lo tanto, la interacción del electrodo con los NTC, también dependerá de la orientación de los NTC sobre esta superficie. Si el contacto entre el electrodo y los NTC se hace a través de los extremos de los NTC, se formarán enlaces más fuertes entre ambas superficies y habrá una mejor conexión eléctrica. Sin embargo, si los NTC interactúan con el electrodo por uno de los lados del tubo, la unión consistirá en enlaces débiles con la superficie interna o externa de la pared de los NTC [126]. Debido a esto, la interacción del electrodo con los extremos de los NTC es más conveniente, al menos cuando se quiera conseguir una unión fuerte, resistente y estable y una conexión eléctrica eficiente. Si se analiza en concreto la interacción entre un electrodo metálico, concretamente un metal de transición (por ej. Ti, Pt, Au), y los NTC, la fuerza del enlace aumenta con el número de orbitales d libres en el metal. Esto es debido a que la unión de la pared de los NTC con el metal está determinada por el

acoplamiento de los orbitales p_z , normales a la superficie de la pared de los NTC, y los orbitales d de los metales de transición [127]. Los enlaces de los extremos de los NTC con metales, se establecen saturando un enlace colgante (o “dangling-bond” en inglés) del plano del grafeno (que de otra forma, formaría un enlace con otro átomo de carbón), con un electrón d del átomo del metal de transición.

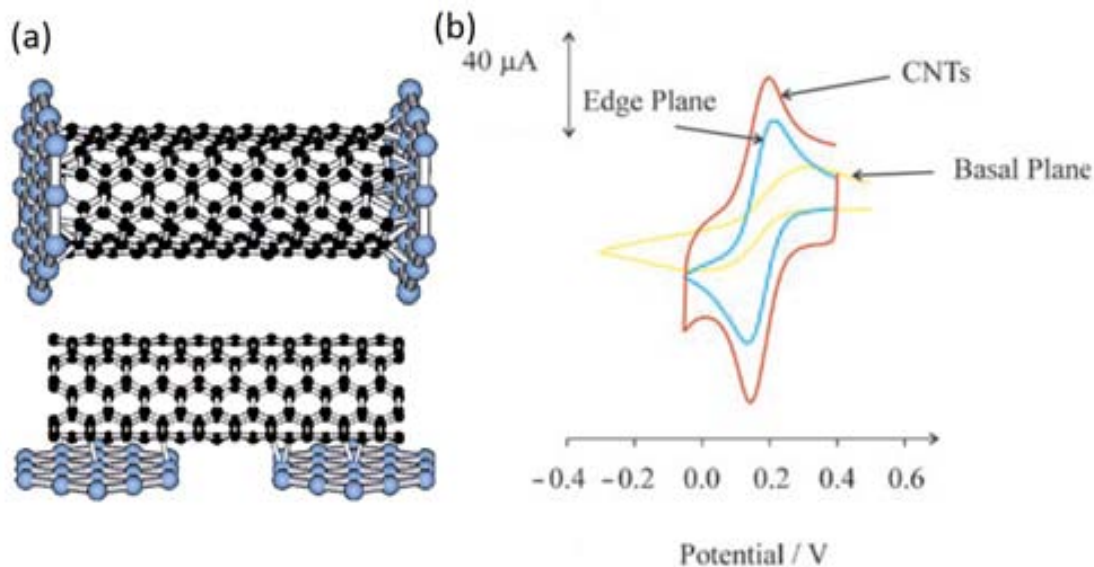


Figura 3.14.: (a) Los dos tipos de interfase electrodo-NTC que pueden existir, unión con el extremo o con la pared de los NTC. (b) CVs obtenidos en FeCN usando alternativamente un electrodo de NTC, el plano-extremo edge-plane del grafito y el plano-basal del grafito [128].

En los años 2000-2005 varios grupos presentaron trabajos donde demostraban las propiedades electroquímicas excepcionales de los NTC. Sin embargo, nadie explicaba porque ocurría un aumento de la corriente y una reducción de la distancia entre los picos de oxidación y reducción en las voltametrías de algunas especies electroactivas al utilizar electrodos modificados con NTC. De todas maneras, el problema principal de los resultados electroquímicos que se mostraban al utilizar NTC era la diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción que obtenían distintos autores al analizar el mismo compuesto, utilizando distintas muestras de NTC [129]. Es más, mientras a veces las corrientes amperométricas medidas con NTC eran similares a las que se obtenían en un sensor de grafito, otras veces las corrientes medidas con NTC eran mucho más altas. Después de unos años de investigación, se ha descubierto que los NTC no presentan en realidad una electroquímica mejor que la del grafito. Por el contrario, los resultados publicados por varios equipos indican que son otros factores los que mejoran el comportamiento electrocatalítico de los NTC. Por ejemplo, las impurezas metálicas tienen una gran influencia en las propiedades de oxidación y reducción de los analitos y son en gran medida responsables del comportamiento electrocatalítico de los NTC. Por otro lado, la funcionalización de los NTC

con grupos que contienen oxígeno y la estructura de los NTC también parece tener un gran efecto en sus propiedades electroquímicas [130]. Finalmente, la superficie porosa que forman los NTC en la superficie de los electrodos hay que analizarla con cuidado. Esta superficie puede generar un efecto de “capa-fina”, en que las señales electroquímicas registradas son producidas por una combinación de la difusión de especies de una solución semi-infinita hacia la superficie del electrodo y por la difusión de estas especies dentro de la capa de NTC. Este efecto produce una reducción en los potenciales de oxidación y reducción, que puede ser mal interpretada como un efecto electrocatalítico [131].

De acuerdo con estas y otras observaciones, cada vez más investigadores defienden que las propiedades electroquímicas y electrocatalíticas de los NTC se pueden comparar en realidad a las del grafito, según lo cual los extremos y paredes de los NTC se comportarían como los planos extremos “edge plane” y basales del grafito, respectivamente [128]. Si se analiza la separación entre los picos de oxidación y reducción en las voltametrías cíclicas (CV) realizadas en ferricianuro 1 mM de la Figura 3.14.b, el electrodo modificado con NTC es el que muestra la menor separación entre picos (58 mV) y el electrodo del plano-extremo del grafito muestra una separación entre picos ligeramente mayor (78 mV). No obstante, el electrodo de grafito en plano-basal muestra una separación de los picos mucho mayor (550 mV). Esta comparación del electrodo modificado con NTC con un electrodo de grafito pirolítico de plano-extremo sugiere que las propiedades electrocatalíticas de los NTC se deben a zonas de plano-extremo que se encuentran en los extremos abiertos de los NTC. También en el electroanálisis de algunos sistemas de oxidación-reducción se concluye que la utilización de NTC no proporciona una gran ventaja respecto a la utilización de electrodos de grafito pirolítico de plano-extremo.

Como se ha comentado, el efecto de las impurezas metálicas en las propiedades electrocatalíticas de los NTC es un factor a tener en cuenta. Los NTC son materiales muy heterogéneos que contienen una gran cantidad de impurezas metálicas y carbonáceas. Se han hecho varios estudios donde se ha demostrado que las impurezas metálicas de Fe, Cu, Mo y Co, de las que algunas son residuos de los metales utilizados para catalizar el crecimiento de los NTC, mejoran las propiedades electrocatalíticas de los NTC hacia distintos analitos [128, 132]. La funcionalización de los NTC con grupos que contienen oxígeno también tiene un efecto en las propiedades electrocatalíticas. Gooding et al. [133] analizaron como después de una fuerte oxidación de los SWCNT la cantidad de grupos carboxilo en los SWCNT aumentaba y el efecto electrocatalítico de estos hacia el ferro/ferricianuro mejoraba. Estos factores explicarían las diferencias de comportamiento entre NTC producidos por diferentes técnicas o incluso provenientes de diferentes lotes de producción.

Otro factor que influye en las propiedades electrocatalíticas de un electrodo modificado con NTC es la densidad de los NTC en la superficie del electrodo. Li et al. señalaron que las propiedades electrocatalíticas de un entramado de NTC de gran densidad es similar a la de un macroelectrodo sólido, porque las capas de difusión de los diferentes NTC se terminan solapando entre sí [134]. Sin embargo, en un

entramado de baja densidad, debido a la separación existente entre los NTC, el comportamiento de cada NTC individualmente se asemeja al de nanoelectrodos independientes. En este caso, la capa de NTC se comportaría como una hilera (“array” en inglés) de nanoelectrodos.

Existen varias estrategias de modificación de superficies de electrodos con NTC [106], entre las que se podrían citar la dispersión y evaporación de suspensiones de NTC, la conjugación química, el autoensamblado, la producción de electrodos de pasta de NTC, la inmovilización abrasiva, inmovilización mediante electropolimerización y el crecimiento directo de los NTC. El método más utilizado es el de la dispersión de solventes, donde primero se dispersan los NTC en un solvente mediante sonicación, luego la dispersión resultante se deposita en la superficie del electrodo y finalmente se deja evaporar y eliminar el solvente. El inconveniente de este método, es que el ensamblaje de las capas de NTC sobre el electrodo es incontrolable, generando superficies irreproducibles.

Aunque tengamos en cuenta que la utilización de NTC para la producción de electrodos no es siempre mejor que la utilización de materiales más económicos como el grafito, no se puede negar el aumento en la sensibilidad que se consigue en algunos ensayos al utilizar los NTC. La primera aplicación de los NTC en electroquímica, fue presentada por Britto et al. [135]. En este trabajo, los NTC se inmovilizaban a la superficie del electrodo mediante la creación de una pasta de NTC con bromoformo y, después, se empaquetaba esta pasta dentro de un tubo de cristal. Desde entonces, la estructura y elevada conductividad eléctrica de los NTC ha sido exitosamente explotada para promover la detección mediante transferencia directa de electrones a/y desde moléculas redox y enzimas como el citocromo c, la HRP [136], la mioglobina y la glucosa oxidasa [137]. Yu et al. proponen una estrategia de modificación en que las enzimas están covalentemente unidas a los extremos de SWCNT verticalmente alineados [136]. Los resultados sugieren que el comportamiento eléctrico de los nanotubos es similar al de un metal que conduce electrones. En este caso, los SWCNT conducen electrones desde el electrodo a los núcleos redox de las enzimas y obtienen un LOD para soluciones de H_2O_2 en tampón de aproximadamente 100 nM.

3.2.2.2. Inmunosensores electroquímicos con NTC

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los inmunosensores electroquímicos y poder conseguir los LODs que se consiguen con métodos como el ELISA, numerosos autores han incorporado los NTC a inmunosensores electroquímicos [138]. El primer paso para la introducción de los NTC en estos sensores es la inmunofuncionalización de los NTC inmovilizando proteínas, enzimas, anticuerpos o antígenos a los extremos o a las paredes de los mismos. En la literatura existen numerosos ejemplos de modificación covalente de los NTC para unir anticuerpos a los extremos de los NTC (Figura 3.15.a). También se ha demostrado que una manera simple de crear conjugados proteína-NTC es la adsorción espontánea de proteínas a las paredes de

los NTC oxidados (Figura 3.15.b). Sin embargo, la adsorción inespecífica de moléculas presentes en la muestra ensayada sobre la superficie de los NTC sigue siendo un inconveniente a la hora de producir ensayos específicos.

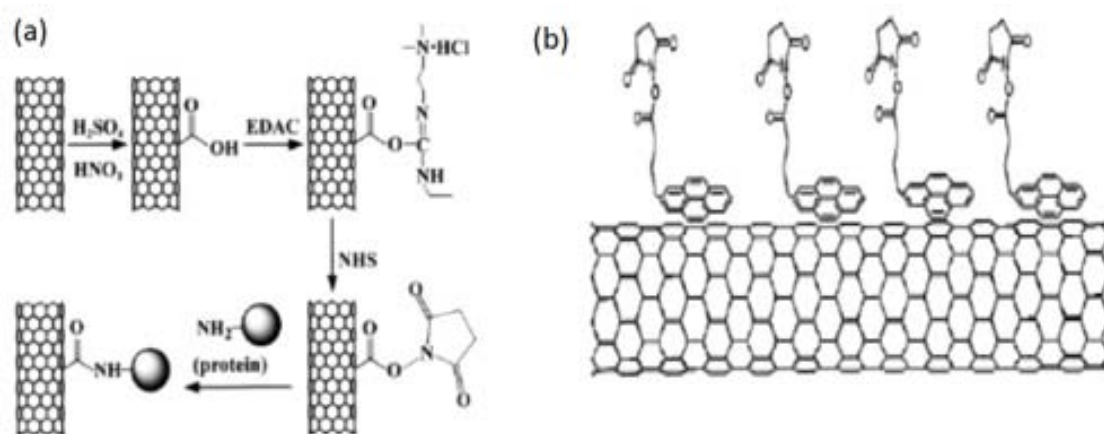


Figura 3.15.: Los métodos de inmovilización de anticuerpos en NTC más utilizados. (a) Unión covalente de las proteínas a los NTC utilizando la química EDAC/NHS. (b) Adsorción inespecífica en los NTC con ácido l-pyrene butanoic, succinimidyl ester [138].

Okuno et al. presentaron un inmunosensor libre de marcador para la detección del antígeno prostático específico (PSA, del inglés “Prostate-Specific Antigen”), basado en una hilera o “array” de microelectrodos modificados con SWCNT [139]. Este inmunosensor se basaba en la detección de la oxidación intrínseca de las proteínas, derivada de sus aminoácidos electroactivos. El resultado fue un inmunosensor de gran afinidad y selectividad, con un LOD de $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ de PSA y que además mostraba niveles inapreciables de adsorción inespecífica.

En otro ejemplo, Liu et al. describieron un método eficiente y reproducible para preparar capas de MWCNT-proteína, aplicables a la producción de inmunosensores electroquímicos [140]. En este método utilizaban la centrifugación para preparar un conjugado de MWCNT con anticuerpo. Después, el conjugado MWCNT-anticuerpo se depositaba en la superficie de un electrodo serigrafiado, nanoestructurando la superficie. De este modo, los autores desarrollaron un biosensor amperométrico competitivo con inmunoelectrodos modificados con capas de MWCNT-anticuerpo que aplicaron a la detección del clenbuterol. El inmunoensayo se realizaba en 16 minutos y el LOD era de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$, al menos un orden de magnitud mejor que el LOD obtenido en un inmunosensor sin MWCNT.

3.2.2.3. Sensores electroquímicos de ADN con NTC

Los NTC han sido ampliamente utilizados para mejorar la sensibilidad en la detección electroquímica de ADN. Como se describió en la Subsección 3.1.2, la detección

de ADN puede realizarse con marcador o sin marcador, y los NTC se pueden utilizar para modificar la superficie de los sensores electroquímicos de ADN de distintas maneras.

Wang et al. propusieron una estrategia en la que se crecían los MWCNT directamente en la superficie de un electrodo de oro mediante (CVD) [141]. Después se carboxilaba el extremo del nanotubo y el shADN, modificado con grupos amino, se enlazaba covalentemente mediante enlaces amida. Para la detección de la hibridación del shADN complementario se añadía un agente intercalante electroactivo, el MB, que era entonces medido electroquímicamente (Figura 3.16). Según sus resultados, las shADN inmovilizadas en MWCNT autoensamblados permitían una hibridación más eficiente que las hebras capturadas sobre MWCNT adsorbidos aleatoriamente sobre el sensor.

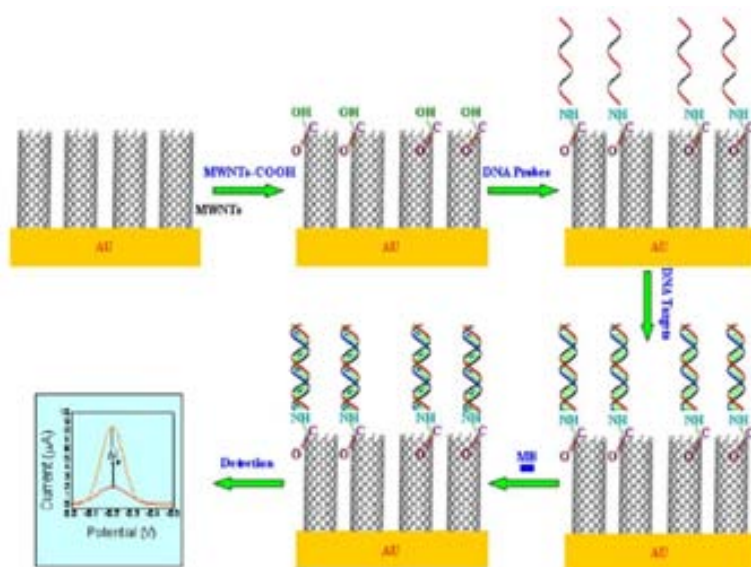


Figura 3.16.: Representación esquemática de la detección electroquímica de ADN en sensores de Au modificados con nanotubos de carbono multicapa [141].

Zhang et al. usaron un electrodo de carbón vitrificado modificado con SWCNT-COOH autoensamblados [142]. Este electrodo de SWCNT se sumergía en una solución con la sonda de shADN que se quería inmovilizar. Para la detección de la hibridación, se sumergía el electrodo modificado en una solución con la hebra complementaria de ADN. Este era un método sin marcador, en que la detección de ADN se llevaba a cabo monitoreando la oxidación de las guaninas. El ensayo mostraba un comportamiento lineal de la altura del pico de oxidación de las guaninas respecto a la concentración de la hebra complementaria de ADN entre 40-100 nM y un LOD de 20 nM .

Ye et al. describieron un método para la detección rápida de shADN y ARN utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con MWCNT [143]. Primero,

prepararon una solución de MWCNT, que se depositaba en la superficie del electrodo de trabajo. Luego, acumulaban una solución de 5 μL de shADN a 0,345 mg mL^{-1} durante 5 minutos en el electrodo y medían la oxidación de las bases nitrogenadas guanina y adenina. El ensayo se podía aplicar a la detección de shADN de 17,0 a 345 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con un LOD de 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de shADN.

3.2.3. Nanoestructuración reversible de la superficie del electrodo

Como se mencionó en la Subsección 3.2.2, la incorporación de NTC a la superficie de un electrodo aumenta su rugosidad y área, proporciona actividad electrocatalítica hacia una gran variedad de moléculas y mejora la transferencia de electrones en las reacciones. Sin embargo, la modificación de los electrodos con NTC es normalmente un proceso irreversible que inhabilita la reutilización del sensor.

Un campo de la bioelectrónica que está avanzando a pasos agigantados es el de la magneto-bioelectrónica, donde se utilizan campos magnéticos externos para controlar los procesos bioelectroquímicos [144]. Este control magnético permite activar o desactivar las reacciones electroquímicas mediante el acercamiento o alejamiento de un imán y, también, permite la modificación de la superficie del electrodo de manera reversible.

De igual modo, la combinación de las excepcionales propiedades de los NTC y de las PMs han hecho posible la optimización de novedosos métodos de modificación de electrodos y de biosensado, aplicables, por ejemplo, a la detección específica de marcadores y moléculas electroactivas [145, 146, 147, 148]. En estos trabajos se demostró que el mezclado de PMs y NTC promovía la adsorción inespecífica de estos últimos sobre la superficie de las PMs, produciendo materiales híbridos. Los híbridos de PM/NTC que se obtienen de esta forma poseen características estructurales, electroquímicas y electromagnéticas que no se pueden alcanzar utilizando estos materiales por separado. Además, aunque en la Subsección 3.2.2 se haya comentado que los NTC no son un material tan ideal para producir electrodos mejorados como se esperaba en un principio, en este caso concreto se utilizan para recubrir físicamente la superficie de las PMs. Aparte de sensar la superficie de las PMs, esta estrategia permite nanoestructurar electrodos de forma muy sencilla, ya que el compuesto de PM/NTC puede ser atrapado magnéticamente sobre la superficie del electrodo de trabajo con un imán. Es más, este método permite la modificación de superficies de manera reversible ya que, al quitar el imán, se puede lavar el sensor y volver a nanoestructurar la superficie.

En una aproximación distinta, Ding et al. crearon un complejo de nanopartículas magnéticas (NPMs) con NTC, realizando el mezclado de NPMs y NTC en un solvente orgánico usando un vórtex [148]. De este modo, creaban NTC magnéticos, cuyo comportamiento demostraron realizando la captura, concentración y detección por cromatografía líquida de estrógenos en leche. El rango lineal de este método era

de $5\text{-}2000 \mu\text{g L}^{-1}$ de estrógenos, obteniendo LODs entre $1,21$ y $2,35 \mu\text{g L}^{-1}$ de 3 estrógenos distintos.

El grupo de Merkoçi et al. utilizó en [145] NPMs modificadas con NTC para aplicaciones de biosensado, y en concreto para la producción de un sensor enzimático que se podía activar o desactivar mediante un imán. Para ello aplicaban un campo magnético externo a un sensor serigrafiado (SPE), que se utilizaba como plataforma transductora (Figura 3.17). Este método lo aplicaron a la detección de catecol y demostraron que el uso de NPM biofuncionalizadas con tirosinasa y mezcladas con suspensiones de NTC proporcionaba un proceso bioelectrocatalítico “desconectable”, que se podía activar o desactivar con la aplicación de un campo magnético. El LOD del ensayo era de $7,61 \mu\text{M}$ de catecol.

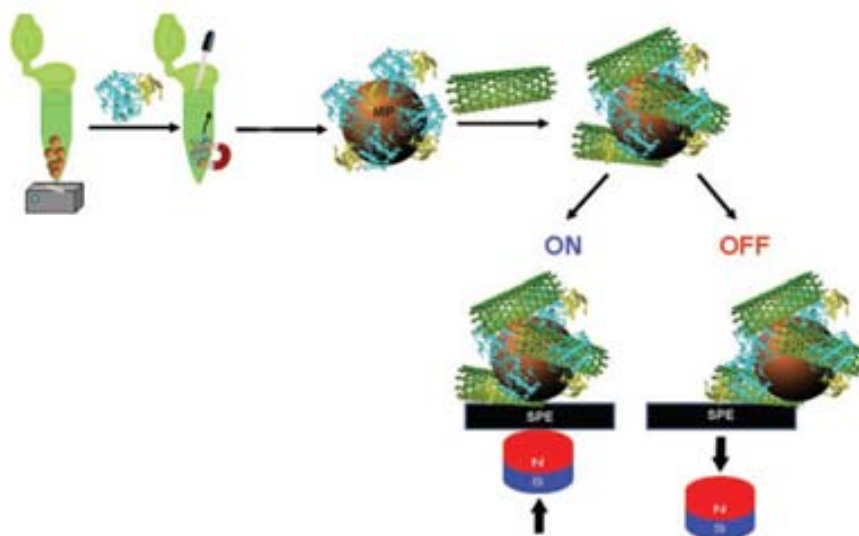


Figura 3.17.: Ensayo enzimático controlado por un campo magnético externo. Primero, se modifican NPM con tirosina y, tras los lavados oportunos, el compuesto NPM-Tyr se mezcla con los NTC. El compuesto NPM-Tyr-NTC es finalmente atraído a un SPE mediante la aplicación de un campo magnético. Tras la detección electroquímica el imán se retira, lo que permite dispersar el compuesto NPM-Tyr-NTC en la solución [145].

La adsorción de NTC sobre la superficie de PMs comerciales, como las *Dynabeads*, también se ha empleado para la producción rápida, simple y reversible de electrodos modificados con nanotubos de carbono (Figura 3.18). Baldrich et al. [146, 149] propusieron realizar la nanoestructuración de superficies mediante este método y demostraron que se producía una mejora de la sensibilidad en la detección de varios analitos de interés presentes en solución. Es más, como la red de NTC que se formaba sobre la superficie de las PMs conectaba estas entre sí y con la superficie del electrodo, el mismo sistema fue posteriormente aplicado al sensado electroquímico de la superficie de las PMs [147]. Esto permitía la detección directa de dianas y marcadores electroactivos, lo cual se demostró realizando la inmunocaptura y detección de dopamina (DA). En este caso, primero se realizaba la captura del analito

mediante las PM y luego estas PM-análito se unían a los NTC para el posterior atrapamiento magnético del compuesto sobre el sensor. En ambos casos, debido a la nanoestructuración de la superficie del electrodo, se consiguieron señales hasta 5 veces superiores que en los sensores sin NTC. En estos trabajos se mostró que el atrapamiento magnético de NTC resultaba eficiente usando *Dynabeads* (Invitrogen, Life Technologies) de 1 y 2,8 μm de diámetro, independientemente de sus propiedades y funcionalizaciones (por ej. superficie hidrofílica o hidrofóbica, superficie modificada con grupos $-\text{NH}_2$, tosilo y con proteína estreptavidina). No obstante, las PMs que mejor resultado dieron para la nanoestructuración de las superficies fueron las PMs de 1 μm de diámetro con superficies funcionalizadas con estreptavidina [149].

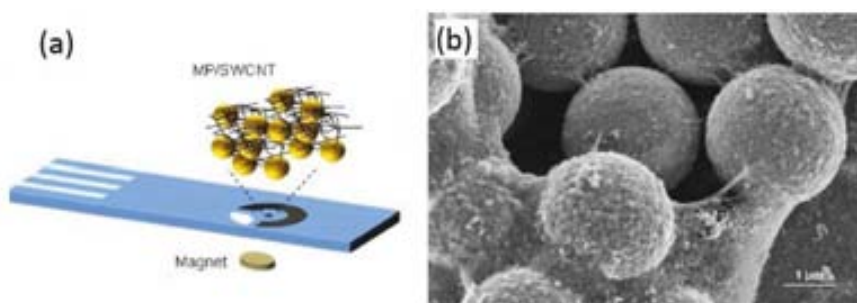


Figura 3.18.: (a) Modificación de un electrodo serigrafiado mediante PM/NTC. El mezclado de PMs y NTC produce la adsorción de los NTC sobre la superficie de las PMs. El compuesto resultante puede ser confinado sobre la superficie de un electrodo de geometría planar colocando un imán bajo el mismo. (b) Imagen de SEM del compuesto PM/NTC atrapado magnéticamente. Como se puede observar, los NTC forman una red tridimensional que recubre las PMs y que las conecta entre sí y con la superficie del sensor sobre el que se han depositado [147].

3.3. Microsistemas analíticos totales (μ TAS)

Puede considerarse que los primeros dispositivos microfluídicos fueron las impresoras de inyección de tinta “inject printers”, creadas por Siemens en 1950 [150]. La microfluídica consiste en la utilización de estructuras micrométricas (1-500 μm) para la manipulación de líquidos y ha sido un campo clave en la reciente revolución que ha supuesto el desarrollo de sistemas de diagnóstico integrados. El concepto de microsistema analítico total (μ TAS), al que se conoce también como Lab On a Chip (LOC), labchip, o Point Of Care (POC), fue introducido en 1990 por Manz et al. [151]. En general se habla de μ TAS para referirse a sistemas analíticos integrados, miniaturizados respecto de los sistemas analíticos tradicionales, que integran en un solo equipo o dispositivo diversas etapas del procedimiento analítico, como obtención y/o pretratamiento de muestra, captura y/o preconcentración del analito y detección del mismo. Para ello los μ TAS incorporan sistemas y programas de tratamiento de señal y análisis de datos, que posibilitan la obtención de datos en tiempo real, in situ, e incluso on-line, y a menudo también estructuras microfluídicas, que facilitan el transporte y mezclado de componentes y el análisis de volúmenes de muestra reducido [152]. Hoy en día se pueden obtener numerosos sistemas microfluídicos y/o μ TAS comerciales, como por ejemplo los dispositivos producidos por Abbot, Agilent, Capiler, Dolomite, Micralyne, Microfluidic Chip Shop, Micrux Technologies, Microliquid y Waters.

La microfluídica ofrece varias ventajas respecto a los procesos químicos y reacciones de bioreconocimiento que se llevan a cabo en soluciones de volúmenes mayores. Por ejemplo, teniendo en cuenta que la difusión es lenta, cuanto menor sea la distancia necesaria para que una interacción ocurra sobre la superficie de un sensor, más rápida será la reacción [153]. Por lo tanto, el llevar a cabo ensayos en flujo contribuye a aumentar el número de moléculas que entran en contacto con la superficie del transductor y pueden ser capturadas específicamente sobre el mismo, a la vez que disminuye el nivel de adsorción inespecífica de otros componentes ya que el flujo aporta un efecto de lavado. Otras ventajas de estos dispositivos son la posibilidad de usar volúmenes reducidos de muestras y reactivos, la limitada generación de residuos y la obtención de cinéticas y tiempos de reacción rápidos. En la actualidad, se han desarrollado varios μ TAS sofisticados que son capaces de manipular simultáneamente múltiples muestras, llevar a cabo varias etapas de procesado, que están integrados y a menudo automatizados. Sin embargo, apenas se han desarrollado, sistemas en los que se inyecte la muestra y se consiga la respuesta sin ninguna manipulación adicional. Un dispositivo LOC ideal debería de realizar la preparativa de la muestra, separar el analito de interés del resto de los componentes de la muestra, concentrarlo cuando resulte necesario y finalmente detectarlo [154]. La preparativa de muestra, por ejemplo, puede requerir de extracción, purificación, preconcentración y, en función de la estrategia de detección, marcado de la diana molecular. La separación se puede hacer por métodos basados en la cromatografía, en la electroforesis, o mediante concentración magnética usando NPM/PMs. Para la detección de

la muestra, se pueden utilizar detectores ópticos, electroquímicos o de espectrofotometría de masa. Finalmente, se necesitan bombas y válvulas para el transporte de los líquidos.

A pesar de los numerosos ejemplos de dispositivos integrados descritos, hay varios problemas que no se han conseguido solucionar totalmente, sobre todo a nivel del tratamiento de las muestras y de la detección y análisis de las señales registradas [155]. Por ejemplo, es sabido que la utilización de transductores miniaturizados genera señales menores, que deben ser medidas con equipos altamente sensibles. Sin olvidar que la formación de burbujas en los canales microfluídicos puede afectar al funcionamiento de los ensayos y de los procesos de detección. Por ello, el grado de integración de la tecnología microfluídica puede variar de tener un cartucho microfluídico desechable que se controla por equipos externos (bombas, sistemas de detección, etc.) y solamente se usa para una parte del proceso analítico, a tener todas las funciones necesarias para el procesado y el análisis de muestra integrados. En la actualidad, la mayoría de los sistemas microfluídicos descritos pueden realizar solo unas pocas funciones de las mencionadas en el apartado anterior. Los criterios más importantes que tienen que cumplir los μ TAS son portabilidad, tiempo de medida corto y coste por ensayo reducido.

Las tecnologías aplicadas en laboratorios centralizados, en términos generales, han sido ampliamente estandarizadas y unificadas mediante la utilización de varios equipos de control y medida. De este modo, el gran reto de los μ TAS se centra en cumplir los requisitos del ensayo, integrando en un solo dispositivo todo el rango de equipos y procedimientos que conforman los protocolos estándar de referencia [156]. En la Figura 3.19 se puede ver un dispositivo POC ideal según [156], que debería de ser capaz de detectar varios analitos en paralelo, en pocos minutos, con sensibilidades en el femtomolar y muestreando volúmenes de no más de $1 \mu L$ de fluido corporal.

A continuación, se mencionarán brevemente los retos que hay que superar en los distintos campos (materiales, tratamiento de superficies, procesado de muestras, diseño e integración de válvulas, control de flujo, incorporación de receptores para los analitos e integración de transductores de la señal) para la creación de dispositivos POC ideales (Figura 3.19).

La primera generación de dispositivos microfluídicos se fabricó utilizando los métodos de fabricación que habían sido anteriormente desarrollados para la producción de MEMS, es decir utilizando la fotolitografía y el grabado (“etching”) en Sala Blanca. Por ello, los primeros dispositivos microfluídicos se fabricaron en silicio, vidrio y cuarzo [157]. Sin embargo, se trata de procedimientos de producción muy costosos y que deben de ser llevados a cabo por personal altamente cualificado y en instalaciones muy sofisticadas. Además, la producción de dispositivos tridimensionales, como canales y/o cámaras microfluídicas, sobre estos materiales no siempre es trivial. Por estos motivos, a lo largo de los últimos años se han explorado materiales poliméricos alternativos, como el poli(dimetilsiloxano) (PDMS), el polimetilmetacrilato (PMMA), el polímero cicloolefínico (COP) y el copolímero cicloolefínico (COC), que se

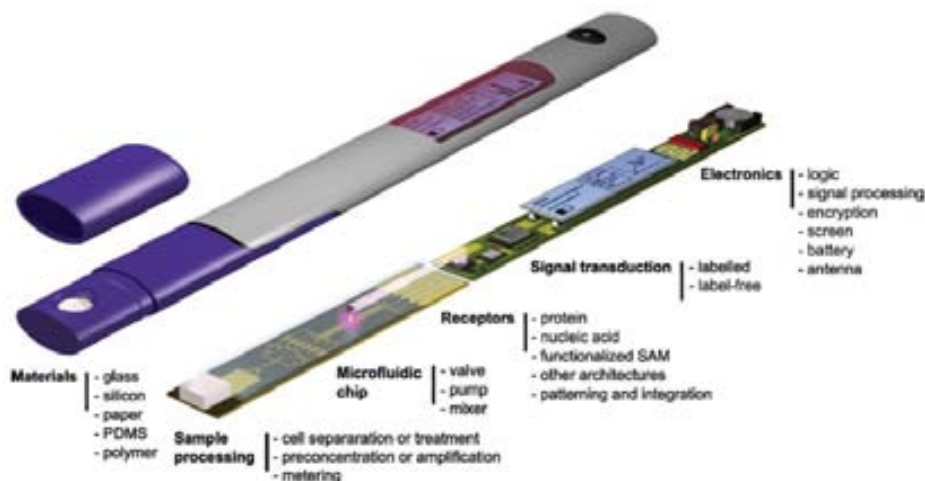


Figura 3.19.: Dispositivo POC ideal. El dispositivo POC ideal no existe todavía, pero los recientes avances en campos como la microfluidica y la producción de nuevos materiales debería permitir la creación de estos dispositivos en un futuro cercano [156].

han convertido en los polímeros más utilizados en la actualidad. En todos los casos se trata de materiales más económicos que los derivados del silicio, más versátiles y fáciles de manipular [154, 158, 159].

El tratamiento de las superficies es una etapa crucial en la fabricación de cartuchos microfluídicos, ya que permite controlar ciertos parámetros como la hidrofobicidad/hidrofilicidad del material y posterior mojado por parte de reactivos y muestra, así como la absorción y la repulsión de reactivos y componentes de la matriz de muestra. En cuanto al pretratamiento de la muestra, los fluidos corporales (saliva, orina y sangre) se caracterizan por su compleja composición y a menudo contienen componentes que pueden interferir en los bioensayos. Por tanto muchas matrices de muestra real necesitan un procesamiento antes del análisis, como la separación de células, preconcentración de analitos de interés, el control y rectificación del pH, o la dilución usando tampones de composición controlada.

Las válvulas de los cartuchos microfluídicos pueden ser controladas de manera activa o pasiva. Las válvulas activas se activan utilizando una fuente de energía externa; es decir, para su funcionamiento requieren un aporte de energía en el momento de su activación. Por el contrario, las válvulas pasivas actúan explotando la energía potencial del dispositivo o de la muestra. En cualquier caso, el control de flujo dentro del cartucho puede requerir de una combinación de válvulas, resistencias y bombas, en la que el bombeado también se puede realizar de manera activa y/o pasiva [160].

En cuanto a la incorporación de bioreceptores para la captura específica de los analitos, uno de los mayores retos es la integración de estos receptores dentro de los canales microfluídicos. Para ello es necesario que el bioreceptor sea incorporado de forma estable, sin que la modificación altere especialmente su funcionamiento y

de forma que soporte las condiciones de su posterior almacenamiento. Finalmente, en la transducción de las señales, el reconocimiento bioquímico de los analitos hay que convertirlo a una señal eléctrica u óptica medible. Para ello, se necesita integrar en el dispositivo el elemento de transducción adecuado para obtener una magnitud física representativa del analito a detectar.

3.4. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se basan en la interacción de la electricidad y la química, es decir, en la relación de parámetros eléctricos como la corriente, el potencial, la carga o la impedancia, con parámetros químicos. Mediante estas técnicas se estudian en general reacciones químicas que implican intercambio de electrones entre moléculas, conocidas también como reacciones redox o reacciones de oxidación/reducción.

3.4.1. Breve introducción a la electroquímica

La electroquímica se utiliza para estudiar los cambios en la distribución de cargas eléctricas que ocurren en la interfase entre un electrodo y una solución cuando se llevan a cabo reacciones (bio)químicas en la superficie o la proximidad del electrodo. Estos cambios pueden ser debidos en general a dos tipos de procesos, Faradaicos y no-Faradaicos. En el primer caso se produce transferencia de cargas a través de la interfase en respuesta a la polarización del electrodo. Este es el tipo de proceso en que se fundamenta la detección voltamétrica y amperométrica, en la que se detecta la oxidación y/o reducción de una especie electroactiva tras aplicarle al electrodo un potencial conocido. Los procesos no-Faradaicos, por su parte, ocurren por la redistribución de cargas dentro de la interfase y son la base de las medidas de impedancia. En cualquiera de los casos, las medidas electroquímicas se realizan en una celda electroquímica, la cual habitualmente está constituida por un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE), y a menudo un contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE). El electrodo de trabajo es el elemento transductor en el que se lleva a cabo la medida electroquímica (por ejemplo una reacción (bio)química que ocurra en la solución o sobre su superficie y que implique intercambio de electrones con el electrodo). El electrodo de referencia es el dispositivo respecto del cual se realiza la medida; por este motivo debe de mostrar un comportamiento conocido y estable a lo largo del tiempo y se mantiene en posición y a una distancia fija de la zona de reacción (básicamente, del electrodo de trabajo). En las celdas de tres electrodos el contraelectrodo se emplea para cerrar el circuito eléctrico con el electrodo de trabajo a través de la solución, evitando con ello que se aplique corriente alguna al electrodo de referencia. Estos tres electrodos tienen que ser de materiales conductores y químicamente estables. Por lo tanto, normalmente, los electrodos suelen ser de materiales como platino, oro, carbono o silicio. La elección del material suele depender del analito que se quiera detectar [161, 162]. Hay que tener en cuenta que es indispensable que el material seleccionado tenga una ventana de potenciales lo suficientemente amplia y apropiada para la detección de la reacción electroquímica del analito de interés y que no interfiera en la misma de ningún modo.

Cuando aplicamos un voltaje a un electrodo, le suministramos energía eléctrica y, de este modo, podemos cambiar la energía de los electrones en ese electrodo [163]. Por lo tanto, podemos alterar la energía del nivel de Fermi del electrodo mediante

la aplicación de un voltaje. En la Figura 3.20 se representa el comportamiento de un mismo electrodo en presencia de la misma molécula en solución tras aplicarle diferentes potenciales. En ambos casos se muestran los niveles de Fermi del metal y los niveles HOMO y LUMO de la molécula en solución, que está en contacto con el electrodo. El nivel HOMO es el orbital molecular más alto (o de más energía) que está ocupado por electrones y el nivel LUMO es el orbital molecular más bajo (o de más baja energía) que está desocupado. En la parte izquierda de la Figura 3.20.a se puede ver que el nivel de Fermi del metal está por encima del orbital molecular ocupado de más energía (HOMO) y por debajo del orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO) de la molécula presente en solución. Por lo tanto, es termodinámicamente desfavorable que se transfieran electrones del electrodo a la molécula, pero los electrones podrán “saltar” de la molécula en solución al electrodo, produciendo la oxidación de la misma. Sin embargo, cambiando el potencial del electrodo se consigue aumentar el nivel de Fermi del metal (Figura 3.20.a derecha). Si entonces la energía del nivel de Fermi del electrodo es mayor que la energía del LUMO de la molécula, el electrón se transferirá a esta. De este modo, se producirá un proceso de oxidación en el metal y un proceso de reducción en la molécula.

El proceso electroquímico puede estar controlado por el transporte de masa (es decir por la rapidez con que se le suministra materia al electrodo) o por la velocidad de transferencia de carga. Por ello comúnmente se habla de procesos controlados por transporte (de masa) o por cinética (de transferencia de carga).

3.4.1.1. Cinética de transferencia de carga

Según se ha discutido en el apartado anterior y se ilustra en la Figura 3.20.a, las reacciones de oxidación/reducción dependen del potencial que se aplique a la celda electroquímica y también del potencial del electrodo (metal en la Figura 3.20.a).

De este modo, para una reacción ($O + ne^- \rightleftharpoons R$) en equilibrio termodinámico, donde no se aplica un potencial externo, las concentraciones relativas de las especies oxidada y reducida de la pareja redox estarán directamente relacionadas con el potencial (E) definido por la ecuación de Nernst (Ecuación 3.2), donde C_O y C_R son las concentraciones de la especie oxidada y reducida en solución, n es el número de electrones involucrado en la reacción y $E^{0'}$ es el potencial de la pareja redox en condiciones estándar. Este representa la diferencia de potencial entre el electrodo y el electrolito a 1 M, en condiciones estándar ($T=25\text{ }^\circ\text{C}$ y $P=1\text{ atm}$).

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (3.2)$$

Del mismo modo, aunque la corriente neta en una reacción en equilibrio termodinámico es cero, existe una corriente, que se representa como corriente de inter-

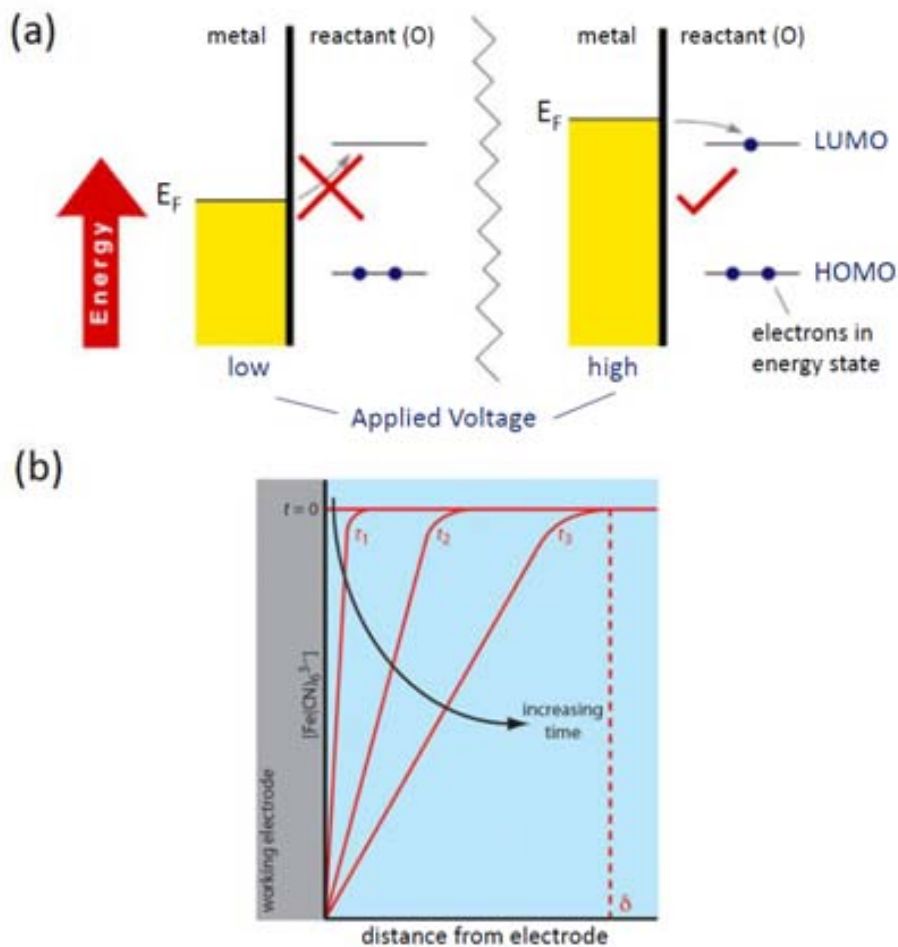


Figura 3.20.: (a) Representación de los niveles de Fermi en un metal tras la aplicación de un potencial. (b) Representación de transporte de masa en una reacción electroquímica.

cambio (i_0) y que es igual en magnitud a la corriente catódica (i_c) y anódica (i_a) (Ecuación 3.3).

$$i_0 = F A k^0 C_O^{(1-\alpha)} C_R^\alpha \quad (3.3)$$

Si se le aplica un voltaje de excitación al electrodo, se generará corriente farádica (la corriente generada en los procesos redox). La magnitud de la corriente generada dependerá de numerosos factores, incluyendo el potencial y área del electrodo de trabajo, el potencial aplicado al mismo, la concentración de la especie electroactiva y la tasa de la reacción de oxidación-reducción. La ecuación corriente-sobrepotencial (Ecuación 3.4) describe la componente catódica o de reducción (primer término) y la componente anódica o de oxidación (segundo término) de la corriente en el caso

de una reacción en equilibrio $O + e^- \rightleftharpoons R$.

$$i = i_0 \left[\frac{C_O(0 \text{ t})}{C_O} e^{-\alpha f} - \frac{C_R(0 \text{ t})}{C_R} e^{(1-\alpha)f} \right] \quad (3.4)$$

Dónde:

i : Corriente que fluye entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

i_0 : Corriente de intercambio (Ecuación 3.3).

$C_O(0 \text{ t})$: Concentración de la especie oxidada en la superficie.

C_O : Concentración de la especie oxidada en solución.

$C_R(0 \text{ t})$: Concentración de la especie reducida en la superficie.

C_R : Concentración de la especie reducida en solución.

α : Coeficiente de transferencia, que mide la simetría de la barrera energética.

$f = \frac{F}{RT}$: Donde, F es la constante de Faraday (96 500 C/mol), R es la constante universal de los gases (8,31 J/mol^oK) y T es la temperatura (^oK).

η : Sobrepotencial o potencial de activación ($E - E_{eq}$).

Para casos en que la solución está siendo mezclada/homogeinizada, o en que la velocidad/tasa de reacción es tan baja que las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas en la superficie no difieren significativamente de las concentraciones en solución, John Alfred Valentine Butler (1899-1977) y Max Volmer (1885-1965) simplificaron la Ecuación 3.4 a la Ecuación 3.5. Esta se conoce como la ecuación de Butler-Volmer y describe la relación entre voltaje y corriente que ocurre en la interfase del material (electrodo), cuando i es como mucho un 10% más bajo que las corrientes límite catódica ($i_{l,c}$) y anódica ($i_{l,a}$).

$$i = i_0 \left(e^{-\alpha f} - e^{(1-\alpha)f} \right) \quad (3.5)$$

La Ecuación 3.5 es una aproximación en la que no se consideran los efectos de transporte de masa. Sin embargo, en una celda electroquímica, como ya se ha comentado anteriormente, hay dos factores fundamentales que intervienen en la tasa de la reacción electroquímica: la rapidez con la que los reactantes y los productos son transportados al electrodo y desde el electrodo (transporte de masa) y la rapidez con la que los electrones pasan del electrodo a los reactantes y productos en solución (cinética de transferencia de electrones) y viceversa.

3.4.1.2. In uencia de transporte de masa

En la Figura 3.20.b, podemos ver una representación esquemática del efecto del transporte de masa en una reacción electroquímica, en este ejemplo la reacción

$Fe(CN)_6^{3-}(aq) + e^- \rightarrow Fe(CN)_6^{4-}(aq)$, que ocurre en solución y es detectada electroquímicamente en la superficie de un electrodo. Antes de aplicar un potencial (es decir, a $t=0$), la concentración de $Fe(CN)_6^{3-}$ es la misma a todas las distancias de la superficie del electrodo. Después de aplicar el potencial, el $Fe(CN)_6^{3-}$ se reduce a $Fe(CN)_6^{4-}$ y su concentración disminuye en la proximidad de la superficie del electrodo. Por lo tanto, para que la reacción siga llevándose a cabo nuevas moléculas de $Fe(CN)_6^{3-}$ tendrán que difundir a través de la solución hasta llegar al electrodo. Cuanto más tiempo apliquemos el potencial ($t_1 < t_2 < t_3$), mayor será la anchura de la capa de difusión.

Hay tres modos de transporte de masa que afectan la velocidad a la que los reactivos y los productos se mueven hacia y desde la superficie del electrodo: difusión, migración y convección.

La difusión ocurre de forma espontánea cuando la concentración de un ion o una molécula en la superficie de un electrodo es diferente a la concentración en el resto de la solución, hasta llegar a un equilibrio termodinámico [164]. Según la primera ecuación de Fick ($J = -D \frac{dC}{dx}$), el flujo difusional es proporcional al gradiente de concentraciones con una constante de proporcionalidad, D , conocida como la constante de difusión [165]. El signo negativo indica que el flujo difusional se dirige desde una zona con una concentración mayor de la especie a una zona con una concentración menor. Esto produce un flujo de reactivos hacia el electrodo, mientras los productos de la reacción fluyen de la superficie electrodo hacia la solución. La región de la solución en la que ocurre la difusión se denomina capa de difusión (δ). Como se ve en la Figura 3.20.b, la anchura de la capa de difusión aumenta con el tiempo, porque el reactante, la molécula $Fe(CN)_6^{3-}$ en el ejemplo, tiene que difundir desde distancias mayores.

La migración es el transporte de masa de partículas cargadas cuando se encuentran en un campo eléctrico en la solución. El flujo de partículas cargadas causado por un campo eléctrico se describe mediante la ecuación ($J = -z_i u_i C_i \frac{d\phi}{dx}$), en la que z_i , C_i y u_i son la carga, la concentración y la movilidad del ion, respectivamente, y ϕ es el potencial eléctrico. La migración es un fenómeno difícil predecir. Por este motivo es habitual intentar suprimirla añadiendo a la solución concentraciones altas de un “electrolito soporte” que resulte química y electroquímicamente inerte [163]. Las sales que se utilizan más comúnmente para ello son KCl o KNO_3 , que también actúan como un conductor, facilitando el paso de la corriente a través de la solución (aumento de la conductividad), comprimiendo la doble capa y manteniendo estable la fuerza iónica del medio durante los experimentos [165].

La convección puede ser “natural” o “forzada”. La convección “natural” ocurre debido a gradientes de densidad y térmicos en el sistema y es generalmente irreproducible. Por lo tanto, no es un efecto deseado en las medidas electroquímicas. La convección “forzada” se da cuando el fluido es mezclado u homogeneizado por una fuerza externa, como por ejemplo una fuente de ultrasonidos, agitación magnética o mecánica, burbujeo de gases o movimiento del electrodo (como es el caso de los

electrodos rotatorios), moviendo los reactantes hacia el electrodo y los productos hacia la solución.

En condiciones experimentales en el que la difusión es el único modo de transporte de masa, la corriente se representa con la Ecuación 3.6. En la que n es el número de electrones que participan en la reacción; F es la constante de Faraday ($F = eN_A$, carga eléctrica por mol de electrones); A es el área del electrodo; D es el coeficiente de difusión de las especies que reaccionan con el electrodo; C_{bulk} y $C_{x=0}$ son las concentraciones en la solución y en la superficie del electrodo y δ es la anchura de la capa de difusión.

$$i = \frac{nFAD(C_{bulk} - C_{x=0})}{\delta} \quad (3.6)$$

3.4.1.3. Geometría del electrodo

Otro factor importante en las medidas electroquímicas es la geometría del sensor. La geometría de los electrodos juega un papel fundamental en el funcionamiento de los sensores electroquímicos, como ha sido discutido por García-González et al. [166]. La ventaja principal de los sensores de tres electrodos (WE, RE y CE) es que la corriente pasa por el CE y así el RE puede mantener un potencial estable. Esto permite medir corrientes más altas, así como realizar medidas a lo largo del tiempo, sin producir interferencia en la medida debida a la deriva del potencial del RE.

El efecto del tamaño del WE ya se ha analizado en los dos apartados anteriores, donde en la Ecuación 3.3 y Ecuación 3.6 se ve como la corriente es proporcional al área del WE. Por otro lado, cuando aumenta la distancia entre el WE y el RE la corriente eléctrica disminuye. La razón de esta disminución se debe a que para conseguir la misma densidad de corriente hay que aplicar un potencial mayor, ya que la caída IR aumenta al aumentar la distancia entre electrodos [167]. También, la longitud de los conectores del WE influye en la respuesta del sensor. La conducción de electrones se hace a través de estos conectores y cuanto más largos son estos mayor es la resistencia. Por lo tanto, la corriente registrada disminuirá a medida que se aumenta la longitud de los conectores.

3.4.2. Técnicas voltamétricas

Las técnicas voltamétricas miden la corriente generada en el sistema en respuesta al potencial aplicado a un electrodo. Las distintas técnicas voltamétricas se distinguen entre sí por el tipo de potencial aplicado, que puede ser una rampa de potenciales, saltos de potencial, o uno o más valores fijos de potencial. Las técnicas más conocidas y empleadas son la voltametría cíclica, las voltametrías de pulso diferencial y onda cuadrada y la amperometría. Estas técnicas se describen algo más extensamente en las secciones siguientes.

3.4.2.1. Voltametría cíclica (CV)

La voltametría cíclica (CV) es una técnica electroanalítica muy utilizada en la caracterización electroquímica. Aparte de proporcionar información cuantificable de analitos electroactivos, es ampliamente utilizada para el estudio de las reacciones de oxidación/reducción y en la caracterización de electrodos.

En la CV, se aplica un barrido de potencial entre un potencial inicial (E_i) y uno final (E_f) a una velocidad constante (Figura 3.21.a). Cuando el potencial llega a E_f el barrido cambia de sentido y vuelve a E_i , donde puede empezar otro barrido. Así, se pueden hacer tantos barridos como se deseen. Como se ve en la Figura 3.21.b, durante el barrido positivo cuando el potencial aplicado llega al potencial de oxidación de un analito (E_{pa}), la forma reducida de este analito se oxida. Aparece entonces un pico de corriente anódico (I_{pa}), que crece hasta que la concentración de la forma reducida del analito en la superficie del electrodo llega a 0 y cuya altura es proporcional a la concentración inicial de este analito. Cuando el barrido cambia de sentido, las moléculas oxidadas generadas en el barrido positivo se reducen, generando un pico de corriente catódico (I_{pc}).

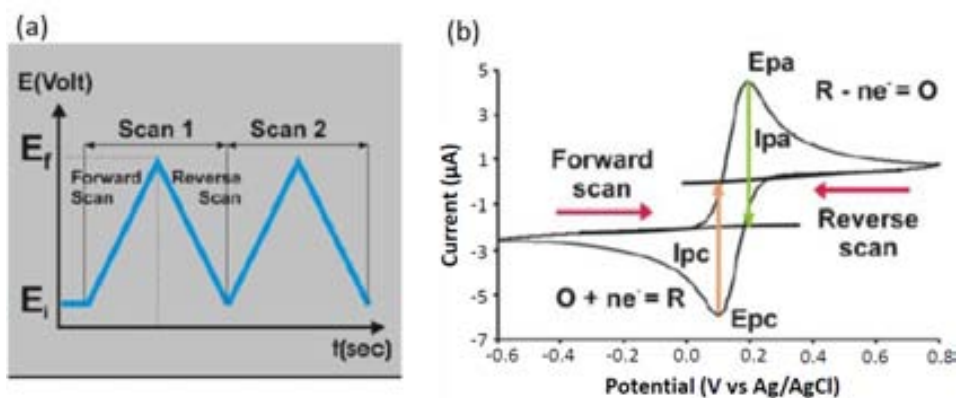


Figura 3.21.: (a) Aplicación del potencial respecto al tiempo en una CV. (b) CV de una reacción reversible.

Las corrientes o alturas de pico (I_{pc} , I_{pa}) y los potenciales en los que ocurren los picos (E_{pc} , E_{pa}) proporcionan una información básica para analizar la respuesta de la CV en una reacción electroquímica reversible. La CV de una reacción electroquímica reversible que ocurre en solución debe de cumplir ciertas características:

1. La separación de los potenciales de oxidación y reducción es ($E_p = \frac{0,0592}{n} V$), donde n es el número de electrones que participan en la reacción. Por lo tanto, en una reacción reversible en la que se intercambia un solo electrón los picos de oxidación y reducción deberían de estar separados 59 mV entre si.
2. La posición (en voltaje) de los picos de oxidación y reducción no varía con la velocidad de barrido.

3. El ratio entre las corrientes de oxidación y reducción es 1, (es decir, $I_{pc} / I_{pa} = 1$).
4. Las corrientes de pico son proporcionales a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($\nu^{1/2}$), según la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 3.7).

$$i_p = 0.4463nFAC \left(\frac{nF D}{RT} \right)^{1/2} \quad (3.7)$$

En la práctica, es prácticamente imposible que una reacción cumpla estas 4 condiciones. Sin embargo, cuanto más eficiente sea la reacción, más se aproximarán los resultados experimentales a los teóricos.

La influencia de la velocidad de barrido en la corriente la podemos analizar en la Figura 3.22.a. Para una reacción limitada por difusión y que ocurra en solución, la altura de pico aumenta linealmente respecto de la raíz cuadrada de la velocidad de escaneo. Por el contrario, las reacciones que ocurren confinadas en superficie (por ej., cuando se detecta un marcador electroactivo inmovilizado en la superficie del electrodo), la corriente registrada mostrará tendencia lineal respecto de la velocidad de escaneo. En la Figura 3.22.b podemos ver el comportamiento de la constante de velocidad (k). La constante de velocidad cuantifica la rapidez de la reacción química, la cual es constante si el catalizador y la temperatura no varían. La k se calcula con la ecuación de Arrhenius $k = Ae^{-\frac{E_A}{RT}}$, donde E_A es la energía de activación, es decir, la energía mínima que se necesita para que la reacción ocurra, A es el factor de frecuencia, que indica la frecuencia de las colisiones y la orientación entre las partículas reaccionantes, R es la constante de gas universal y T la temperatura.

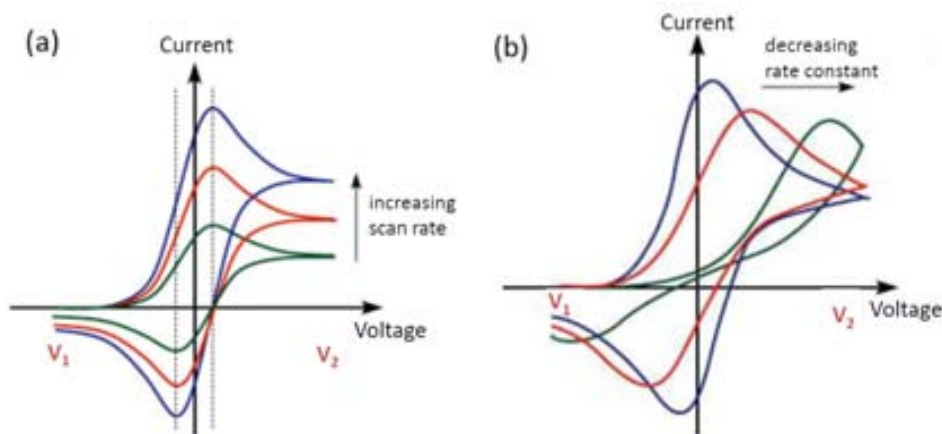


Figura 3.22.: (a) CVs que muestran la influencia de la velocidad de barrido (en inglés, scan rate) (ν) en la altura de los picos registrados. (b) CVs que muestran la influencia de la constante de velocidad (en inglés, rate constant) (k) en la posición y altura de los picos registrados.

3.4.2.2. Voltametría de pulso diferencial (DPV)

Con el objetivo de aumentar la rapidez y sensibilidad de las medidas, se han ensayado varias formas de aplicación de potencial alternativas a la CV para excitar la celda electroquímica, y la voltametría diferencial de pulso (DPV) es una de ellas. En la DPV se hace un barrido de potencial aplicando una serie de pulsos. Cada pulso de potencial es fijo (E_p) y tiene una amplitud pequeña de 10 mV a 100 mV . Estos pulsos están superpuestos a un barrido de potenciales que cambia lentamente (E_s). La corriente se mide en dos instantes de cada pulso (1 y 2 en la Figura 3.23.a). El primer instante es justo antes de la aplicación del potencial y el segundo al final del pulso. Estos puntos de muestreo se seleccionan para permitir el decaimiento de la corriente no farádica. En una DPV es la diferencia en las medidas de corriente en estos 2 puntos ($i_p = i_2 - i_1$) la que se determina y representa respecto del potencial base del pulso (Figura 3.23.b). Al eliminar gran parte de la corriente no faradaica o ruido de fondo, la DPV suele generar picos más altos que la CV y se considera una técnica más sensible.

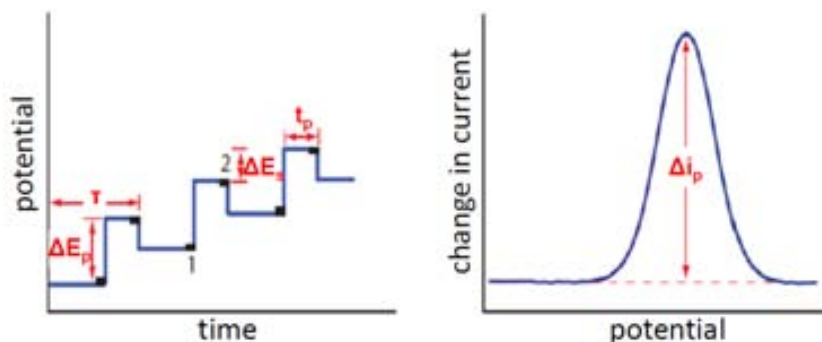


Figura 3.23.: (a) Gráfica que muestra como se aplica la señal de excitación en una DPV. (b) Ejemplo de una gráfica obtenida por DPV.

3.4.2.3. Voltametría de onda cuadrada (SWV)

La SWV es una técnica electroquímica muy potente que se puede aplicar tanto para medidas de electrocinética como para medidas analíticas [168]. Utilizando la SWV se pueden aplicar señales de excitación de amplitudes grandes y de velocidades de barrido rápidas, posibilitando la detección del analito a muy bajas concentraciones discriminando la corriente de fondo.

En la Figura 3.24 se ilustra la señal de excitación que se aplica en una SWV. La excitación de la celda comienza en un potencial (E_{st}) que está en la mitad de los dos extremos de potencial de la onda cuadrada. La onda está formada por pulsos consecutivos hacia potenciales más altos o más bajos, a los cuales se les añade o resta un potencial escalón. Este incremento de potencial (E_p) es la diferencia de altura que hay entre dos ondas consecutivas. La amplitud de la onda cuadrada se

representa como (E_{SW}). La duración de cada pulso es la mitad del periodo del escalón ($t_p = \tau/2$) y la frecuencia de la señal es la inversa del periodo del escalón ($f = 1/\tau$). Dependiendo de la dirección de barrido de la señal de excitación aplicada, se pueden distinguir las corrientes *forward* (I_f , cuando se mide la corriente al aplicar el pulso en el sentido del barrido) o *backward* (I_b , cuando se mide la corriente al aplicar el pulso en el sentido contrario del barrido). Las corrientes se miden en los últimos microsegundos de cada pulso y la diferencia de la corriente medida en dos pulsos consecutivos se registra como respuesta $I = I_f - I_b$.

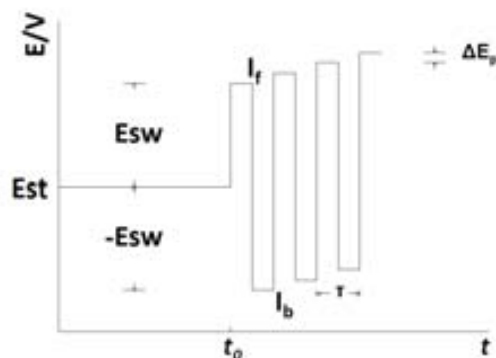


Figura 3.24.: Señal de excitación en la voltametría de onda cuadrada.

La respuesta de la SWV consiste de puntos discretos de corriente y potencial, separados por un incremento de potencial (E_p). Este valor determina la velocidad de barrido ($v = E_p \cdot f$) y la densidad de información de la respuesta. Las corrientes medidas con E_p más pequeñas son menores que las corrientes que se generan de la interpolación entre 2 puntos, cuando se aplican E_p -s más grandes. Por lo tanto, al igual que en la CV, si la velocidad de barrido aumenta, aumenta la corriente.

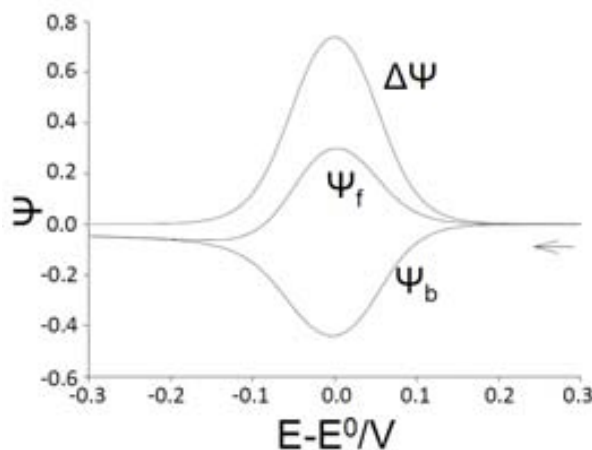


Figura 3.25.: SWV teórica de una reacción rápida y reversible, donde se representa la respuesta no dimensional (Ψ).

En el caso de una reacción reversible se obtiene una gráfica como la que se muestra en la Figura 3.25. En este caso, (Ecuación 3.8) es la respuesta no dimensional, donde n es el número de electrones que participan en la reacción, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, c_0 es la concentración y D es la constante de difusión de las especies oxidadas y reducidas. El voltamograma se caracteriza por la respuesta neta máxima I_p .

$$= - I_p nFAc_0(Df)^{1/2} \quad (3.8)$$

3.4.2.4. Cronoamperometría

En la cronoamperometría se aplica un potencial constante al electrodo y se mide la respuesta en corriente en función del tiempo. El potencial que se aplica a la celda electroquímica es un poco más positivo/negativo que el potencial de oxidación/reducción de la especie que queremos analizar. De esta forma, una especie oxidada que se encuentre en la solución, cerca del electrodo, se reducirá si se le está aplicando al mismo un potencial cercano al potencial de reducción de esa molécula; cuanto más tiempo se mantenga el potencial, serán las especies oxidadas más alejadas del electrodo las que se reducirán también, aumentando la capa de difusión (Figura 3.20.b).

La ecuación que más se utiliza en cronoamperometría es la ecuación de Cottrell, la cual describe la corriente de respuesta esperada para una reacción electroquímica reversible cuando se aplica un potencial (Ecuación 3.9). En esta ecuación, n es el número estequiométrico de electrones que participan en la reacción, F la constante de Faraday, A el área del electrodo en (cm^2), C_o la concentración de especies electroactivas ($mol\ cm^3$) y D_o la constante de difusión de las especies electroactivas ($cm^2\ s$).

$$i = \frac{nFAC_oD_o^{1/2}}{1 + 2t^{1/2}} \quad (3.9)$$

3.4.3. Espectroscopía de impedancia (EIS)

La impedancia (Z) es un parámetro que mide la oposición que ofrece un circuito al paso de una corriente eléctrica alterna. La expresión matemática de Z es la siguiente: $Z = V_{ac} / I_{ac}$, donde V_{ac} e I_{ac} se aplican a los potenciales y a la corriente que varían con el tiempo. La impedancia de un circuito de corriente alterna depende de la frecuencia de la señal que se aplica. Si el V_{ac} y el I_{ac} están en fase y el valor de la resistencia es independiente de la frecuencia, la impedancia será una simple resistencia ($Z = R$).

Un espectro de impedancias es en realidad un listado de los valores de Z registrados a diferentes frecuencias de la señal aplicada.

La espectroscopía de impedancia (EIS) se mide aplicando un V_{ac} a una celda electroquímica y midiendo la corriente de respuesta de la celda. Si aplicamos un voltaje sinusoidal de excitación, la respuesta a ese voltaje será un I_{ac} . Si se quiere excitar la interfase, pero sin perturbar el estado de equilibrio que se ha establecido, se utilizan señales de excitación lo suficientemente pequeñas para que no cambien el estado eléctrico de esta interfase. Si se utilizan valores de voltaje de polarización muy pequeños, la ecuación de Butler-Volmer (Ecuación 3.5) se queda reducida a la Ecuación 3.10, donde ($B = \frac{b_a b_c}{2,3(b_a + b_c)}$), es la relación de pendientes de Tafel, con ($b_a = \frac{2,3RT}{\alpha n F}$) y ($b_c = \frac{-2,3RT}{(1-\alpha)n F}$) [163].

$$I = B \frac{dI}{d\eta} = \frac{B}{R_p} \tag{3.10}$$

Por lo tanto, la EIS se mide con una señal de excitación pequeña. Así, la corriente de respuesta de la celda es pseudo lineal (Ecuación 3.10). En un sistema lineal o pseudo lineal la corriente de respuesta de un voltaje sinusoidal también será una sinusoidal de la misma frecuencia pero desfasada. Las celdas electroquímicas no son lineales; sin embargo, si miramos una pequeña parte de la curva IV de una celda, puede considerarse lineal. En las medidas de EIS se aplica un V_{ac} pequeño a la celda (1-10 mV). En este caso, como se ve en la Figura 3.26, el sistema es pseudo lineal.

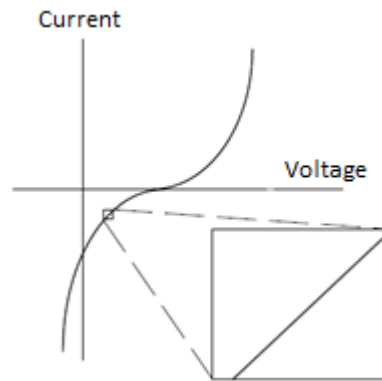


Figura 3.26.: Curva IV que se genera al aplicar un potencial alterno. Si miramos una pequeña parte de la curva se puede considerar lineal.

Si expresamos el voltaje de excitación como $E_t = E_o e^{j\omega t}$, la corriente de respuesta será $I_t = I_o e^{(j\omega t - \phi)}$. Por lo tanto, la impedancia se expresará como la Ecuación 3.11.

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_o e^{j\phi} = Z_o (\cos\phi + j \sin\phi) \tag{3.11}$$

En general para caracterizar una impedancia hay que especificar la magnitud Z y la fase ϕ de la respuesta, en función de la frecuencia f del potencial de excitación. Estas tres magnitudes se representan en una gráfica de Bode. Como la frecuencia en una medida de espectroscopía puede variar de 100 kHz a menos de 1 mHz, el eje de la frecuencia (eje X) se representa en escala logarítmica. De igual forma, como Z puede variar en un experimento en un factor de 10^6 o más, también el eje Z (eje Y) se representa en escala logarítmica.

Otra representación gráfica de la EIS es la gráfica de Nyquist. Como ya se ha comentado anteriormente, la $Z(\omega)$ tiene una componente real y otra imaginaria. Así, si la componente real se representa en el eje X y la componente imaginaria en el eje Y, obtenemos una representación Nyquist. Cada punto de la gráfica corresponderá al valor medido de impedancia, cuando se aplica un pulso a una frecuencia conocida. Como se muestra en la Figura 3.27, la impedancia se representa con un vector de módulo Z y el ángulo del vector respecto al eje X es la fase $\phi = \arg Z$.

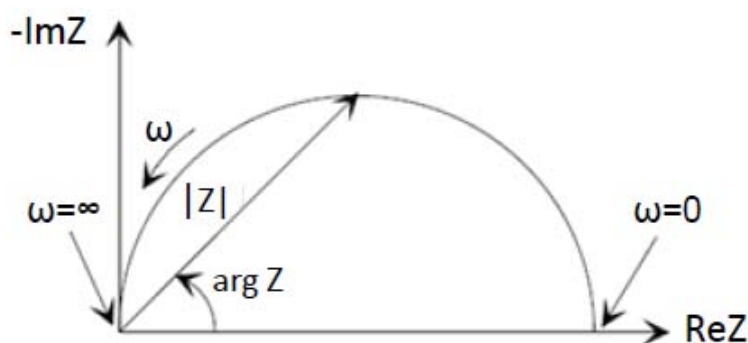


Figura 3.27.: Representación de la impedancia en una gráfica Nyquist.

Para interpretar lo que ocurre en la celda electroquímica mediante una gráfica de Nyquist, se relaciona la gráfica con un circuito equivalente, en que se intenta representar todos los elementos que pueden estar participando en el sistema. La mayoría de los elementos del circuito son resistencias (R), condensadores (C) o inductancias (L). Las impedancias de estos elementos eléctricos son los siguientes:

- para una resistencia, $Z = R$
- para un condensador, $Z = 1/j\omega C$
- para una inductancia, $Z = j\omega L$

Si analizamos estas expresiones, se observa como la resistencia es independiente de la frecuencia y no tiene componente imaginaria. Por lo tanto la corriente a lo largo de una resistencia está en fase con el voltaje. La impedancia de un condensador solo tiene componente imaginario y su valor disminuye a medida que aumenta la frecuencia. Es más, la corriente a lo largo de un condensador está desfasada -90° respecto del voltaje. La impedancia de una inductancia también tiene solo componente

imaginario, pero su valor aumenta cuando aumenta la frecuencia. La corriente a lo largo de una inductancia está desfasada 90° respecto del voltaje.

A continuación, se detallan los elementos más comunes que se encuentran prácticamente en todas las celdas: R_s , C_{dl} y R_{ct} .

- La resistencia del electrolito o la solución (R_s) se podría definir *grosso modo* como la resistencia que se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. La R_s depende básicamente de la composición de la solución (concentración y tipo de iones), de la temperatura y de la geometría del área por donde pasa la corriente (tamaño del electrodo de trabajo y distancia entre este y el electrodo de referencia).
- Por otro lado, en la celda electroquímica, en la región que incluye la interfase electrodo-solución, se genera una distribución de cargas conocida como doble capa eléctrica. Por un lado, está el electrodo, es decir, una superficie metálica cargada, y por otro lado está otra capa formada por una distribución de exceso de carga de la solución, hacia el interior de la solución. De manera simplificada, este efecto se puede describir como dos placas paralelas cargadas y separadas una distancia. Esta separación es muy pequeña, del orden de angstroms. Como las cargas separadas por un aislante forman un condensador, este efecto se relaciona con un condensador. La capacitancia de la doble capa (C_{dl}) depende de muchos factores, como el potencial del electrodo, la temperatura, la concentración de iones, el tipo de iones, la rugosidad del electrodo, etc.
- La R_{ct} es la resistencia de transferencia de carga y representa la resistencia de una reacción en equilibrio. En una reacción de oxidación/reducción *Red* $Ox + ne^-$ la rapidez de transferencia de carga entre las especies oxidadas y reducidas dependerá del tipo de reacción, de la temperatura, de la concentración de los analitos de la reacción, del potencial que se aplique y del material del electrodo que se utilice.

Como se ha mencionado, la interpretación de los resultados de la EIS se hace ajustándolos a un circuito equivalente “ideal”. El circuito equivalente más común y el que se utiliza en este trabajo para entender el comportamiento de la celda electroquímica, es el circuito conocido como el circuito de Randless. Este circuito consiste en una R_s , en una R_{ct} y en una C_{dl} (Figura 3.28). En altas frecuencias el condensador aparece en cortocircuito, es decir, conduce libremente obteniéndose solo la contribución de R_s , la resistencia de la solución. En bajas frecuencias, sin embargo, el condensador aparece en circuito abierto obteniéndose las contribuciones del R_s y del R_{ct} .

En la Figura 3.28 la C_{dl} puede ser calculada a partir del valor de la frecuencia para el punto más alto del semicírculo. La R_s , equivale en la gráfica de Nyquist al punto en que la semicircunferencia corta el eje X cerca del origen, a altas frecuencias. El otro extremo de la semicircunferencia que corta con el eje X es la suma $R_{ct} + R_s$. Por lo tanto, el diámetro de la semicircunferencia nos permite estimar el valor de R_{ct} .

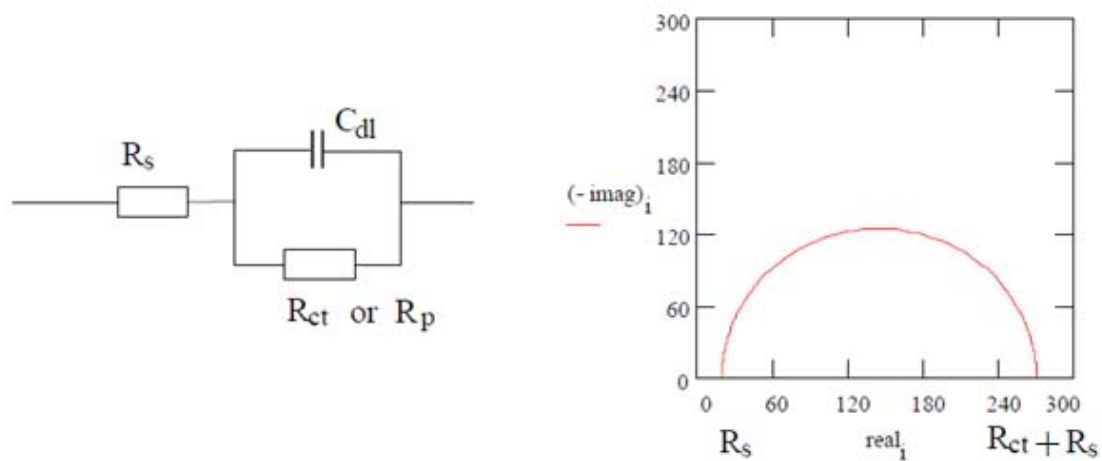


Figura 3.28.: Circuito equivalente Randles y representación Nyquist correspondiente.

El análisis de EIS que se realiza en este trabajo no tiene en cuenta el efecto de la difusión. Esta genera un componente denominado Warburg, cuya impedancia describe la resistencia que ofrece el sistema en la difusión de especies en la interfase solución-electrodo [169].

4. Materiales, métodos y descripción del sistema

4.1. Materiales, biocomponentes y reactivos químicos

4.1.1. Reactivos/productos químicos

Todos los reactivos se han obtenido del mayor grado de pureza posible y, a menos que se detalle lo contrario, se han utilizado directamente sin realizar ninguna purificación o modificación adicional. En la Tabla 4.1 se resumen los diferentes reactivos empleados.

Por otro lado, los nanotubos de carbono monocapa carboxilados (NTC; C > 90.0%; 4-5 nm ϕ ; 0.5-1.5 μm de largo; Ref. 652490), son de Sigma-Aldrich (Madrid).

4.1.2. Tampones y soluciones

Todas las soluciones y tampones fueron preparadas con agua desionizada de resistividad mínima de 18 M $\Omega \cdot cm$. Las soluciones se esterilizaron mediante filtrado (usando filtros de un tamaño de poro de 0,2 μm de diámetro) o autoclavado. La Tabla 4.2 detalla el nombre abreviado, la composición y pH de las diferentes soluciones empleadas.

4.1.3. Partículas magnéticas

En este trabajo se han utilizado micropartículas magnéticas suministradas por Invitrogen (Life Technologies, Reino Unido). Estas son esferas poliméricas superparamagnéticas de tamaño uniforme, compuestas por una matriz polimérica porosa embebida de óxido de hierro y recubierta con una capa polimérica adicional que estabiliza la estructura y previene la pérdida del material magnético. A lo largo de la tesis, se han utilizado partículas magnéticas (PM) de distinto diámetro y recubrimiento, siendo todas hidrofóbicas. Las más utilizadas son las PM modificadas con estreptavidina (PM dynabeads MyOneTM Streptavidin T1 ($\phi = 1 \mu m$) y M280 ($\phi =$

2,8 μm), 10 mg mL^{-1}). También se han utilizado PM modificadas con grupos tosilo (PM dynabeads MyOneTM Tosylactivated ($\phi = 1 \mu\text{m}$), 100 mg mL^{-1}).

Reactivo	Abreviación	Proveedor	Referencia
Acetato de sodio		Sigma-Aldrich	W302406
Acetona		Panreac	1007
Ácido ascórbico	AA	Sigma-Aldrich	A5960
Ácido bórico		Merck	100165
Ácido cítrico		Sigma-Aldrich	251275
Ácido nítrico	HNO ₃	Sigma-Aldrich	438073
Ácido úrico	AU	Sigma-Aldrich	U2625
Albúmina de suero bovino	BSA	Sigma-Aldrich	A2153
Azul de metileno	MB	Sigma-Aldrich	M9140
Biotina		Sigma-Aldrich	B4501
Bismuto (III) nitrato pentahidrato	Bismuto	Sigma-Aldrich	383074
Clorobenceno		Scharlab	CL0111
Dimetilformamida	DMF	Sigma-Aldrich	227056
Dopamina	DA	Sigma-Aldrich	H8502
1-etilo-3-[3-dimetilaminopropilurea] carbodiimida clorhidrato	EDC	Fluka	39391
Etanolamina		Sigma-Aldrich	E9508
Ferroceno carboxilado	Fc-COOH	Sigma-Aldrich	46264
Ferrocianuro de potasio	FeCN	Sigma-Aldrich	P3289
Fosfato dibásico de sodio		Sigma-Aldrich	S5136
Hoechst 33258		Sigma-Aldrich	861405
Metanol		Panreac	1091
N-hidroxisuccinimida	NHS	Thermo Scientific	24500
OiR		Fujifilm	OIR 908-35
Polivinilpirrolidona	PVP	Sigma-Aldrich	PVP40
Revelador de sustancia fotoendurecible positiva	Revelador	Fujifilm	OPD 4262
Sulfato de amonio		Fluka	83267
Tampón de fosfato salino	PBS	Sigma-Aldrich	P5368
TRIZMA clorhidrato	Tris	Sigma-Aldrich	T3253
Tween 20		Sigma-Aldrich	P7949

Tabla 4.1.: Reactivos empleados en la tesis.

4.1.4. Biocomponentes

Los anticuerpos utilizados a lo largo de esta tesis se detallan en la Tabla 4.3.

Nombre	Composición	pH
PBS	Fosfato 0,01 M; NaCl 0,138 M; KCl 0,0027 M	7,4
PBST	PBS 0,01 M y tween 0,05 %	7,4
Tampón acetato	Acetato de sodio 0,2 M	5,6
Tampón de amonio sulfato	Amonio sulfato 3 M en tampón borato	9,5
Tampón borato	Ácido bórico 0,1 M y 5 N NaOH para ajustar el pH	9,5
Tampón citrato	Ácido cítrico 0,1 M y fosfato dibásico de sodio 0,2 M	4,2
Tampón etanolamina	Etanolamina 0,5 M en tampón borato	9,5

Tabla 4.2.: Composición de las soluciones tamponadas empleadas en la tesis.

La proteína mieloperoxidasa (MPO; Ref. ab98926) ha sido provista por Abcam (Cambridge, UK) y el suero sanguíneo humano (Ref. H4522) que se ha empleado para las medidas de MPO en matrices de muestra real es de Sigma-Aldrich.

El ADN utilizado en esta tesis es un UltrameroTM DNA Oligo de 126 bases sintetizado por Integrated DNA Technologies (IDT; Leuven, Bélgica). La secuencia de este ADN es la siguiente: 5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAA GAT TTG - 3', con un contenido de guaninas y citosinas del 30 % y un peso molecular de 38 867,1.

Descripción (tipo)	Modificación	Producidos en	Diana molecular	Proveedor
Anti-glucosa oxidasa (policlonal)	Biotina	Conejo	Glucosa-oxidasa	Abcam
Anti-IgG de conejo (H+L) (policlonal)	Biotina	Cabra	Conejo	Invitrogen
Anti-MPO humana (monoclonal)	Biotina	Ratón	MPO	Hyttest Ltd.
Anti-troponina humana (policlonal)	(NH ₂)	Conejo	Troponina	Nb4d-ICAQ, CSIC

Tabla 4.3.: Descripción de los distintos anticuerpos utilizados en la tesis.

4.1.5. Substratos enzimáticos

En cuanto a los substratos enzimáticos empleados en estas medidas se han utilizado substratos enzimáticos comerciales de TMB, que se constituyen de mezclas de TMB y H₂O₂ listas para usar y con una composición y concentración no revelada por los suministradores. El 3,3',5,5' tetrametilbencidina Substrato Líquido (TMB; Ref.

0440) para las medidas espectrofotométricas es de Sigma-Aldrich (Madrid) y los sustratos “TMB-Based Enhanced K Blue” (TMB mejorado) y “K-Blue Aqueous” (TMB acuoso) utilizados para las medidas cronoamperométricas son de Neogen Corporation (Escocia, Reino Unido).

4.1.6. Otros componentes y materiales

Los nanocristales de CdS fueron fabricados por el grupo *Nanobiotechnology for Diagnostics* (liderado por la Dra. Pilar Marco) del *Institut de Química Avançada de Catalunya* (Nb4d-ICAQ, CSIC). Estos cristales se fabricaron siguiendo el método de micro reacción por micelas reversa, obteniéndose nanopartículas de aproximadamente 3 nm de diámetro [38]. Después, las CdS fueron enlazadas covalentemente a través de la química de la carbodiimida a anticuerpos anti-troponina (Tabla 4.3), producidos en conejo también en este laboratorio.

Para la fabricación de los sensores en Sala Blanca se han utilizado obleas de pyrex (Borofloat 33 de 700 μm de espesor y de 100 mm de diámetro de University WAFER), láminas de COP (Ref. ZF14100, Zeon Chemicals) y un cartucho de COP fabricado por Placisa (Gipuzkoa) usando el COP (Ref. 1420R, Zeon Chemicals). El PSA (del inglés “pressure sensitive adhesive”, Ref. Progene 24-UC-500) es de UltiDENT Scientific.

4.2. Sensores electroquímicos utilizados en los ensayos

A lo largo de esta tesis se han utilizado sensores comerciales serigrafados (SPE, del inglés “Screen printed electrode”) de DropSens (Oviedo), y sensores de capa fina microfabricados en la sala blanca de IK4-Ikerlan (Tabla 4.4). Estos últimos han sido producidos tanto sobre sustrato de pyrex como sobre materiales poliméricos de menor coste. Todos los dispositivos contenían 3 electrodos: electrodo de trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE). En esta sección se describirán las características de cada uno de los dispositivos y el proceso de fabricación de los electrodos de capa fina. El protocolo de lavado y activación aplicado a cada tipo de dispositivo se describirá en la Subsección 4.5.1.

4.2.1. Electrodos serigrafados

Se han utilizado 6 tipos de dispositivos diferentes, todos de dimensiones y geometría similares, pero WE de los siguientes materiales: oro (Au-SPE; Refs. C223BT y 220BT), platino (Pt-SPE; Ref. 550), carbono (C-SPE; Ref. 110), carbono modificado

Electrodo	Material del WE	Diámetro del WE	Substrato
Au-SPE (a)	Oro	4 mm	Cerámico
Au- SPE (b)	Oro	1,6 mm	Cerámico
C-SPE	Carbón	4 mm	Cerámico
Pt-SPE	Platino	4 mm	Cerámico
MWCNT-SPE	MWCNT	4 mm	Cerámico
AuNP-SPE	Nanopartículas de oro	4 mm	Cerámico
Chip Pt	Platino	2,1 mm	Pyrex
Cápsula Au	Oro	2,1 mm	Pyrex
Cartucho	Platino	2,1 mm	COP

Tabla 4.4.: Características de los sensores electroquímicos usados en la tesis.

con MWCNT (MWCNT-SPE; Ref. 110CNT) y carbono modificado con nanopartículas de oro (AuNP-SPE; Ref. 110-GNP) (Tabla 4.4 y Figura 4.1). El tamaño de los chips es de 3.4 x 1.0 x 0.05 cm y, excepto el electrodo Ref. C223BT ($\phi = 1,6$ mm), todos tienen un WE de 4 mm de diámetro. El RE es de plata y el CE de platino en el Pt-SPE, de oro en el Au-SPE y de carbono en los C-SPE, MWCNT-SPE y AuNP-SPE.

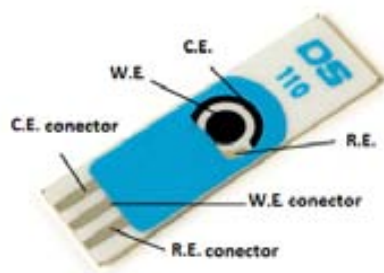


Figura 4.1.: C-SPE (Ref. 110) de DropSens, con WE y CE de carbono y RE de plata.

4.2.2. Electrodo de capa fina fabricados en sustrato de pyrex

A lo largo de esta tesis se han fabricado dos tipos de sensores sobre sustrato de pyrex:

- Sensores de Pt sobre pyrex (chip Pt). Estos sensores contienen 3 electrodos (WE, CE y RE) de Pt. El WE tiene un diámetro de 2,1 mm y de cada oblea de pyrex ($\phi = 100$ mm) se obtienen 16 sensores independientes (Figura 4.2.a).
- Sensores con WE de Au y CE y RE de Pt (cápsula Au). El WE tiene un $\phi = 2,1$ mm y de cada oblea de pyrex se obtienen 32 sensores independientes (Figura 4.2.b).

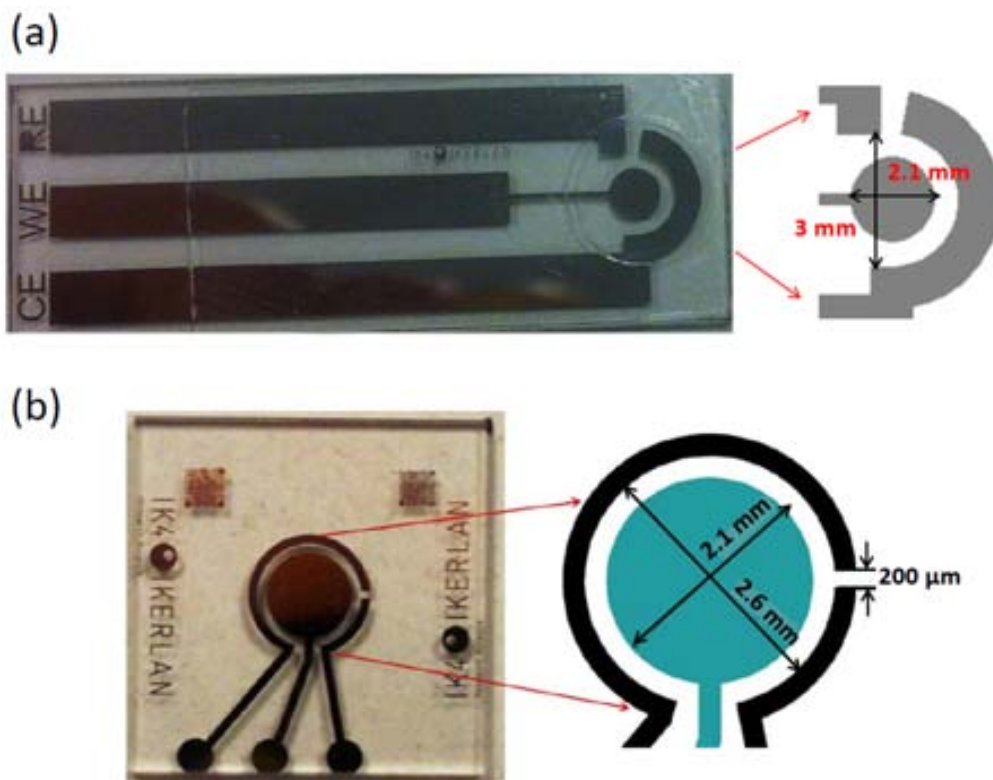


Figura 4.2.: Electrodo de capa fina fabricados en Sala Blanca de IK4-Ikerlan en sustrato de pyrex. (a) Sensor con WE de Pt. El área activa del dispositivo ha sido delimitada con una lámina transparente de PSA, en la que se ha perforado una ventana circular que deja expuestos los 3 electrodos. (b) Sensor con WE de Au.

Aparte de tener el WE de distinto material, la geometría de los sensores es distinta. La distancia entre los electrodos RE-WE es de $500 \mu\text{m}$ y de $263 \mu\text{m}$ en el sensor de Pt (chip Pt) y en el sensor de Au (cápsula Au), respectivamente, y las pistas son más cortas en este último.

En la Figura 4.3 se muestra un esquema simplificado de las distintas etapas del proceso de fabricación de sensores sobre sustrato de pyrex, que son las siguientes:

- Deshidratación. Primero se deshidrata la oblea de pyrex en un plato caliente durante 5 minutos a 200°C .
- Recubrimiento con fotoresina. La fotoresina (OiR) se deposita sobre la superficie de la oblea usando un rotor de disco (Spin Coater M-Spin 150, RAMGRABER GmbH), para conseguir un recubrimiento homogéneo de la oblea. Después se calienta la oblea a 90°C en un plato caliente durante 5 minutos para evaporar el solvente.
- Fotolitografía. Se han empleado máscaras de acetato, diseñadas utilizando el programa CleWin 4 (consultar la Figura A.1 para el diseño de la máscara del

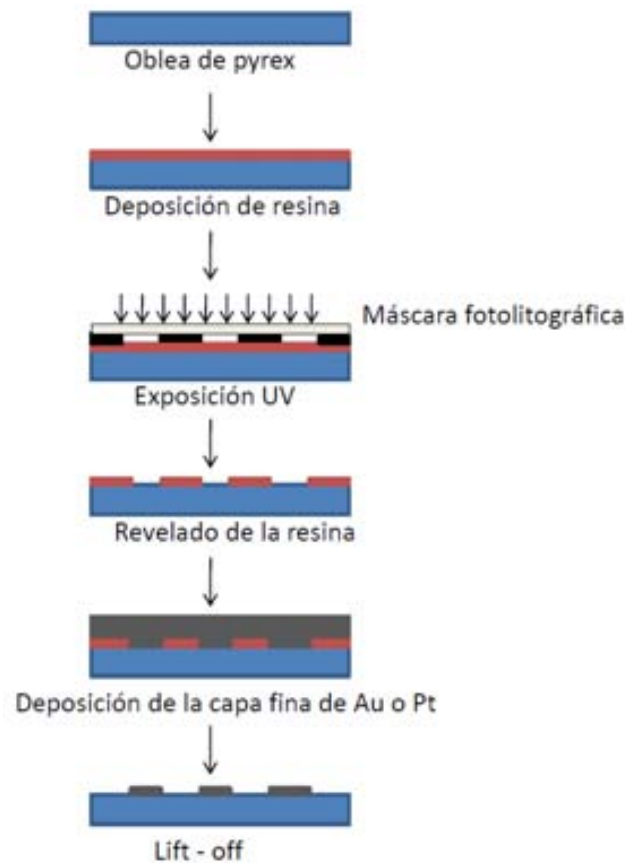


Figura 4.3.: Representación esquemática simplificada de la fabricación de electrodos de capa fina sobre sustrato de pyrex.

chip Pt y la Figura A.2 para el diseño de la máscara de la cápsula Au). El alineado de oblea y máscara y el proceso fotolitográfico se han llevado a cabo en un equipo Karl Süss MA6/B6 (Süss MicroTek). La luz ultravioleta (UV) se emite con una $E = 250 \text{ mJ}$, a una distancia de alineamiento de $50 \mu\text{m}$ y con un contacto en vacío entre la máscara y la oblea durante la exposición. Las máscaras de acetato dejan pasar la luz UV solo por las zonas en las que están definidos los electrodos. Como la OIR es una resina positiva, al hacer el revelado posterior, la OIR será eliminada de las zonas que han sido expuestas a la luz UV.

- Revelado de OIR. Tras la exposición, se realiza el revelado de la resina. Se suspende la oblea en un revelador de resinas positivas (Tabla 4.1) durante 20 segundos 2 veces, eliminando la resina de la superficie que ha sido expuesta a UV. A continuación se hace un último lavado en agua y se seca la oblea en un secador rotatorio (Spin Dryer, RAMGRABER GmbH).
- Deposición del metal. La deposición de Pt se realiza por pulverización catódica de metales, “sputtering”. El equipo que se utiliza es el Pfeiffer Vacuum Classic 500. Todos los procesos se hacen en un flujo de Ar de $0,1 \text{ sccm}$ y a una presión

de $2,7 \times 10^{-3} \text{ mbar}$. Antes de empezar con la deposición de cada metal, se realiza un “presputtering” para eliminar las impurezas que se pueden encontrar en la superficie del blanco.

Para mejorar la adhesión del Pt al pyrex, primero se deposita una capa fina de Ti. Para ello, tras un “presputtering” de Ti, se realiza la deposición de este metal a una potencia de 100 W durante 3 minutos. Luego, tras un proceso de “presputtering” del Pt, se deposita el Pt a 200 W durante 6 minutos. Estas dos capas de Ti y Pt tienen un espesor total de 145 nm .

La deposición de Au también se hace tras la deposición de una fina capa de Ti, para mejorar la adhesión del Au al pyrex. Antes de empezar con la deposición de Au se realiza un “presputtering”. Después este metal se deposita a 100 W durante 6 minutos. El espesor de la capa de Au es de 100 nm .

- “Lift off”. Tras la deposición del metal, se elimina el resto de la fotoresina. Como la resina está en toda la oblea menos en los electrodos, tras este proceso solo quedará el metal de los electrodos en la oblea. Para ello, se somete la oblea a 2 lavados con acetona de 5 minutos cada uno y un lavado con metanol (de 5 min) en un baño de ultrasonidos. Finalmente, se limpia la oblea con agua y se seca en el secador rotatorio.
- Corte de los chips. La oblea, con 16 chips independientes en el caso de los chips del Pt y con 32 chips independientes en el caso de las cápsulas de Au, se corta con una cortadora Disco DAD-321.
- Delimitación del área de sensado. Para delimitar el área activa de los chips, proteger las pistas y evitar que la gota de solución depositada para las medidas electroquímicas se disperse por todo el dispositivo, se utiliza una lámina de adhesivo sensible a la presión (PSA). Para cortar la geometría deseada en el PSA se utiliza una cortadora FC8000 Series de Graphtec.
- Llegados a este punto los dispositivos pueden ser directamente ensamblados con un conector eléctrico para su utilización, sin necesidad de realizar pasivado, “wire bonding”, encapsulado o procesos adicionales.

4.2.3. Fabricación en lámina de COP

Para facilitar la integración de los sensores electroquímicos en un cartucho microfluídico, también se ha llevado a cabo la fabricación de electrodos sobre una lámina de COP. Una vez producidos, estos dispositivos se insertan entre los componentes de un cartucho microfluídico, producido también en COP, adhiriéndose sobre la base del mismo (Figura 4.4). El COP es un polímero que se caracteriza por tener una baja tasa de absorción de la humedad, buena estabilidad térmica y un módulo de elasticidad elevado. Además el COP presenta unas propiedades ópticas excepcionales, es resistente pero muy fácil de manipular (se puede cortar con unas tijeras) y

tiene un coste significativamente inferior al de otros materiales como el pyrex o el silicio.

Los sensores fabricados sobre COP en este trabajo también son de Pt y tienen un WE de $\phi = 2,1 \text{ mm}$. De cada lámina de COP se obtienen 8 dispositivos con electrodos, que posteriormente se pegan al cartucho microfluídico.

- Montaje de la lámina de COP. La lámina de COP se adhiere sobre una oblea de pyrex mediante cargas electrostáticas, que se generan a 26 kV con un generador de cargas estáticas Modelo GCG/30 de Airtalde (Vizcaya).
- Tratamiento en plasma de oxígeno. Se somete entonces la lámina de COP a un tratamiento de plasma de oxígeno para eliminar las impurezas que pueda haber sobre su superficie y a la vez hacerla más hidrofílica. Este tratamiento se realiza en O_2 a 0,4 mbar y 100 W durante 2 minutos, en un equipo Low Pressure Plasma System de Diener Electronic (Alemania).
- Recubrimiento con fotoresina. La fotoresina (OiR) se deposita sobre la superficie de la lámina de COP usando un rotor de disco (Spin Coater M-Spin 150, RAMGRABER GmbH), para conseguir un recubrimiento lo más homogéneo posible.
- Tratamiento de infrarrojos. Se procede con un tratamiento en ciclos con una lámpara de infrarrojos para que el solvente se evapore. Se realizan 75 ciclos, cada uno de ellos consistente en una exposición de 5 segundos con la lámpara encendida a 1000 W y 5 segundos en reposo con la lámpara apagada.
- Fotolitografía. Como en el caso anterior, las máscaras son de acetato y se han diseñado utilizando el programa CleWin 4 (Figura A.3). Tras el alineamiento de oblea y máscara se realiza una exposición a luz UV con una $E = 325 \text{ mJ}$ y una distancia de alineamiento de $100 \mu\text{m}$. En este caso la exposición se realiza en modo suave (soft), lo que significa que la oblea y la máscara están en contacto suave. Como la geometría de los sensores no tiene una estructura fina, es decir, de la escala de los micrómetros, no hace falta que la máscara y la oblea estén en contacto para definir la estructura de una manera más precisa.
- Revelado de OiR. Tras la exposición se realiza el revelado de la resina utilizando un revelador de resinas positivas y siguiendo el mismo procedimiento que en la Subsección 4.2.2. A continuación, se hace un último lavado en agua y se seca la oblea en un secador rotatorio (Spin Dryer, RAMGRABER GmbH).
- Deposición del metal. En este caso, antes de empezar con la deposición, se aplica un procedimiento de limpieza a la lámina de COP, que se hace con plasma de O_2 a 0,65 sccm, a una presión de $4,3 \times 10^{-3} \text{ mbar}$ y a 100 W durante 5 minutos, usando el mismo equipo donde se hace la posterior metalización (Pfeiffer Vacuum Classic 500).

La deposición de Pt se realiza, tras un “presputtering”, con un flujo de Ar a 0,1 sccm y a una presión de $2,7 \times 10^{-3} \text{ mbar}$. En este caso la deposición

se hace en ciclos. Para ello se realizan 100 ciclos consecutivos en los que se efectúa la pulverización catódica de metales a 100 W durante 10 segundos y el sistema se mantiene en reposo (apagado) durante 20 segundos más. La deposición del metal a ciclos evita el calentamiento excesivo de la lámina de COP. El espesor de la metalización de Pt que se consigue tras este proceso es de aproximadamente 400 nm.

- “Lift off”. La eliminación final de los restos de resina se hace directamente en metanol en el baño de ultrasonidos mediante un proceso que dura 5 minutos. Finalmente se limpia la lámina con agua y se seca en el secador rotatorio.
- Corte y pegado de los dispositivos. Finalmente, se cortan las láminas de COP para individualizar los 8 chips que se obtienen en cada oblea y se realiza el ensamblado del cartucho microfluídico mediante soldadura química. Esto se hace pulverizando clorobenceno en el anverso de la lámina de COP y pegándolo inmediatamente al cartucho microfluídico de COP. En la Figura 4.4.a se muestra una imagen del chip de Pt sobre COP, obtenida con un microscopio óptico Leica DMLM, y en la Figura 4.4.b se puede ver este sensor integrado en el cartucho microfluídico.

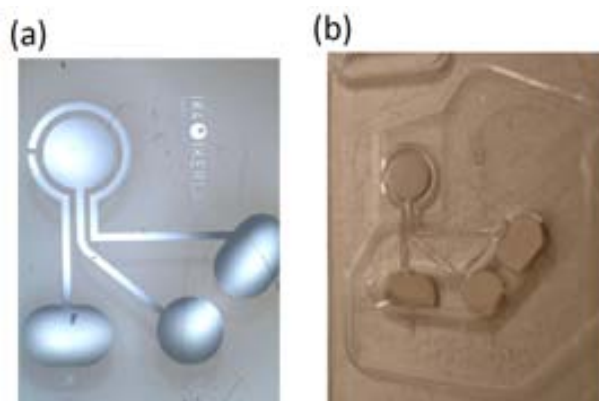


Figura 4.4.: Chip de Pt metalizado sobre COP antes (a) y después del ensamblado en un cartucho micro uídico (b).

4.3. Nanoestructuración de la superficie del electrodo

En la Subsección 3.2.2 se han presentado las ventajas que pueden aportar los NTC en la detección electroquímica de distinto analitos. Por otro lado, en la Subsección 3.2.1 se han discutido las ventajas que aportan las PM en los ensayos, sobre todo en cuanto a captura del analito, separación del mismo de otros componentes de la solución y posterior concentración mediante confinamiento magnético de las PM-analito sobre

la superficie del sensor. La combinación de estos dos tipos de micro-nanomateriales es la base de la estrategia de nanoestructuración de electrodos que se presenta en esta tesis (Subsección 3.2.3). La mayor aportación de este método, que resulta sencillo y rápido, es que, contrariamente a la mayoría de procedimientos descritos anteriormente, permite la nanoestructuración de la superficie de manera reversible. A continuación se detallan los pasos seguidos para realizar la nanoestructuración de las superficies mediante el conexionado de las PM con NTC.

4.3.1. Preparación de la suspensión de NTC

Para la preparación de la suspensión de NTC (SWCNT-COOH), seguimos el protocolo optimizado por Olivé-Monllau et al. [149], con pequeñas modificaciones. Para ello 10 mg se suspendieron en 10 mL de agua destilada y se sonicaron en un sonicador S15H Elmasonic que trabaja a 37 kHz durante 1 hora y 30 minutos, hasta que se obtuvo una suspensión estable. Para evitar el calentamiento del agua del sonicador, se cambiaba el agua cada 15 minutos. Se observó que el tiempo de sonicación necesario para la producción de suspensiones de NTC con un comportamiento electroquímico óptimo, dependía de la frecuencia a la que operaba el sonicador. Por lo tanto, después de los primeros 60 minutos de exposición a los ultrasonidos, el comportamiento electroquímico de los NTC se analizaba cada 5 minutos, nanoestructurando un electrodo con estos (Subsección 4.3.3) y realizando una medida electroquímica.

Estas suspensiones de NTC se mantienen estables hasta 4 meses, sin necesidad de hacer ningún tratamiento adicional de sonicación [149].

4.3.2. Manipulación de las PM y modificación con anticuerpo y Fc-COOH

4.3.2.1. Manipulación de las PM

Las PM que se han utilizado a lo largo de esta tesis son las Dynabeads (Invitrogen™). Estas, como ya se introdujo en la Subsección 3.2.1, son esferas superparamagnéticas de poliestireno de tamaño uniforme y con una superficie definida. Dependiendo de la funcionalización de la superficie, se utilizarán en una aplicación u otra. En nuestro caso, se han utilizado PM de 1 y 2,8 μm de diámetro con la superficie modificada con estreptavidina y también PM de 1 μm de diámetro modificadas con grupos tosilo. La estreptavidina, permite capturar y modificar las PM con moléculas biotiniladas, como por ejemplo, anticuerpos biotinilados. Los grupos tosilo pueden conjugarse con grupos amino (NH_2) de las proteínas u otras moléculas.

Antes de su uso, se aplica un protocolo de lavado a las PM, lo cual permite eliminar el tampón en que se almacenan (que contiene entre otros componentes azida de sodio, que es tóxica y puede interferir en algunos procesos) y resuspender las PM en el

tampón más adecuado para su modificación o utilización. Para ello se transfiere la cantidad necesaria de PM ($X \mu L$, 10 mg mL^{-1}) a un eppendorf de $1,5 \text{ mL}$. A continuación se coloca el eppendorf en el imán de un rack magnético (Bilatest magnetic separator, Sigma-Aldrich) y tras 2 minutos, cuando las PM se han concentrado en la proximidad del imán, se elimina el sobrenadante con la pipeta. Después se añade 10 mM de PBS a un volumen tres veces mayor ($3X \mu L$) que el volumen original de las PM. Se vuelve a colocar el eppendorf en el imán, se vuelve a quitar el sobrenadante y se añaden de nuevo 10 mM de PBS ($3X \mu L$) para realizar un segundo lavado. Finalmente, se resuspenden las PM en un volumen de PBS 2 veces mayor que el volumen original de las PM ($2X \mu L$), obteniéndose una suspensión con una concentración de PM de 5 mg mL^{-1} .

Para la utilización de las PM modificadas, estas se atemperan unos minutos, se recupera el volumen de PM necesario para el ensayo y se lavan las PM 2 veces con PBS inmediatamente antes de su utilización. Las incubaciones se llevan a cabo en tubos eppendorf en volúmenes de muestra de ($nX \mu L$, $n > 1$). Durante los experimentos se ha observado que la adición de BSA 0.1% al tampón de incubación reduce significativamente el nivel de adsorción inespecífica sobre las PM y mejora la reproducibilidad de los ensayos. Todas las incubaciones que se realizan con las PM se hacen en rotación a 24 rpm en un Mini LabRollerTM Rotator (Sigma-Aldrich, Madrid) para prevenir la sedimentación de las PM, protegidas de la luz y a temperatura ambiente. A menos que se detalle lo contrario, tras el ensayo se realizan 2-3 lavados de 5 minutos cada uno en rotación utilizando PBS.

4.3.2.2. Modificación de las PM con anticuerpo

Modificación de las PM-estreptavidina con un anticuerpo biotinilado

Las PM-estreptavidina permiten una incorporación muy eficiente y sencilla de moléculas biotiniladas a la superficie de las PM debido a la gran afinidad de la interacción biotina-estreptavidina ($K_d = 10^{-15}$).

El protocolo de modificación de las PM-estreptavidina con anticuerpo empieza con los lavados descritos en el apartado anterior. Entonces, teniendo en cuenta que según el proveedor 1 mg de PM-estreptavidina M280 y T1 capturan hasta 10 y $20 \mu\text{g}$ de anticuerpo biotinilado, respectivamente, se incuban las PM-estreptavidina en PBS 10 mM con las cantidades correspondientes de anticuerpo durante 30 minutos. Después se concentran las PM-anticuerpo en el rack magnético durante 2 minutos y se lavan tres veces con PBS 10 mM siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación, se bloquea la superficie de las PM con biotina $2,5 \text{ mM}$ durante 15 minutos, para que no queden estreptavidinas libres expuestas a la solución, y se vuelven a lavar las PM. Este paso resulta necesario porque cada anticuerpo biotinilado puede exhibir en superficie un número variable de biotinas. Por este motivo cuando las PM-anticuerpo no son tratadas con biotina libre, la reacción cruzada entre biotinas y lugares de unión libres en las estreptavidinas produce

agregación de las PM a lo largo del tiempo, lo cual acorta su tiempo de vida. Finalmente, se resuspenden las PM-anticuerpo en PBS, BSA 0.1 % a una concentración final de 5 mg mL^{-1} de PM-anticuerpo y se almacenan a 4°C hasta su utilización.

Modificación de las PM-tosilo con un anticuerpo (-NH₂)

Las PM-tosilo se enlazan covalentemente a cualquier ligando (anticuerpo, proteína, péptido o glicoproteína) con grupos amino o sulfhidrilo.

El protocolo de modificación de las PM-tosilo con un anticuerpo NH₂ empieza con los lavados descritos en el apartado anterior, pero en este caso en tampón borato (Tabla 4.2). Según el proveedor, 5 mg de PM-tosilo capturan $100 \mu\text{g}$ de ligando. De este modo, se resuspenden las PM-tosilo con el anticuerpo correspondiente en $200 \mu\text{L}$ de tampón borato, se añaden $100 \mu\text{L}$ de tampón de amonio sulfato y se incuba la mezcla durante la noche. Después se concentran las PM-anticuerpo en el rack magnético durante 2 minutos, se elimina el sobrenadante y se añaden $200 \mu\text{L}$ de tampón etanolamina, $100 \mu\text{L}$ de tampón de amonio sulfato y se realiza otra incubación durante 4 horas para inactivar los grupos tosilo que hayan quedado sin reaccionar. Finalmente, se concentran de nuevo las PM-anticuerpo en el rack magnético, se elimina el sobrenadante y se llevan a cabo los lavados en PBST con 1 % PVP. El almacenamiento de las PM-anticuerpo hasta su utilización se hace a una concentración final de 40 mg mL^{-1} en PBST con 1 % PVP a 4°C .

4.3.2.3. Modificación de las PM con Fc-COOH y captura de dianas no electroactivas

Para poder sensar electroquímicamente dianas moleculares no electroactivas sobre la superficie de las PM, en esta tesis se ha optimizado un protocolo de detección que emplea PM modificadas químicamente con un marcador electroactivo, Fc-COOH. Cuando la diana no electroactiva es capturada sobre la superficie de las PM-Fc, sombreará o recubrirá físicamente parte de los marcadores de Fc y, consecuentemente, se producirá una disminución del pico de Fc en la medida electroquímica como se mostrará en la Sección 7.4 (Figura 7.17).

Para ello, primero hay que conjugar el Fc-COOH a la superficie de las PM, para lo cual se han usado PM-estreptavidina T1. En este protocolo se activan los grupos -COOH del Fc-COOH con una carbodiimida (EDC) en presencia de una hidroxisuccinimida (NHS), lo cual incrementa la eficiencia de la reacción y produce intermediarios más estables que la utilización de solamente EDC. El resultado de la reacción es un éster, que reacciona con grupos amino (-NH₂) formando una amida estable. Siguiendo el protocolo de modificación de Baldrich et al. [147], se disuelven el NHS, el EDC y el Fc-COOH en DMF a concentraciones finales de 200 mM , 100 mM y 100 mM , respectivamente, y la mezcla se incuba durante 45 minutos. El Fc-COOH activado con EDC/NHS se diluye entonces en PBS a una concentración final de 16 mM , lo que se hace añadiéndolo gota a gota a 10 mM de PBS mientras se agita el eppendorf en un agitador vórtex para evitar la precipitación del Fc-COOH.

En paralelo, se lavan 3 veces $150 \mu\text{L}$ de PM-estreptavidina con $300 \mu\text{L}$ de PBS utilizando un rack magnético. Después, las PM se resuspenden en $150 \mu\text{L}$ de PBS suplementado con la concentración deseada de Fc-COOH activado con EDC/NHS y se incuban durante 2 horas y 30 minutos. A continuación, las PM funcionalizadas con Fc (PM-Fc) se lavan 2 veces y se bloquean con 50 mM Tris durante 15 minutos. En este contexto el Tris aporta un exceso molar de grupos amino que, al reaccionar con los grupos activos remanentes, contribuye a inactivarlos; se trata por tanto de un bloqueo químico para parar la reacción. Finalmente, las PM-Fc se lavan 3 veces más en PBS, se resuspenden a una concentración final de 5 mg mL^{-1} en PBS con 0.05% BSA y se almacenan a 4°C .

4.3.3. Atrapamiento magnético de NTC

La modificación de electrodos mediante el atrapamiento magnético de NTC se basa en la habilidad de estos de adsorberse inespecíficamente sobre la superficie de PM. Los compuestos de PM/NTC resultantes pueden ser entonces confinados sobre la superficie de un electrodo con la ayuda de un imán. El protocolo de modificación se describió inicialmente para PM recubiertas de proteína y usando suspensiones de NTC preparadas en PBS, que resultaban inestables y poco reproducibles a lo largo del tiempo [146]. Más tarde se demostró que el atrapamiento magnético de NTC podía llevarse a cabo también sobre PM con otros tipos de recubrimiento y que la utilización de suspensiones acuosas de NTC, que eran estables durante más de 4 meses, resultaba más reproducible [149]. Sin embargo los NTC suspendidos en agua eran tan estables que no se adsorbían sobre la superficie de las PM. La resolución de este imprevisto consistió en la adición de un pequeño volumen de solución salina concentrada (PBS 30 mM) a la mezcla de PM y NTC. De esta forma los iones del medio contribuyen a apantallar las cargas superficiales de los NTC carboxilados, desestabilizándolos. En estas condiciones los NTC tienden a formar haces que en presencia de las PM, se adsorben sobre la superficie de las mismas.

Para llevar a cabo este método, se lavan $5 \mu\text{L}$ de PM-estreptavidina (10 mg mL^{-1}) 3 veces con PBS 10 mM y se resuspenden en $10 \mu\text{L}$ de este tampón salino. Luego se añaden $4 \mu\text{L}$ de PBS 3 veces concentrado (PBS 30 mM) y $5 \mu\text{L}$ de NTC (SWCNT-COOH; 1 mg mL^{-1}), y el compuesto se mezcla por pipeteado durante 20 segundos. El atrapamiento magnético del compuesto PM/NTC se promueve mediante la colocación de un imán de neodimio ($\phi = 4 \text{ mm}$; Supermagnete, Gottmadingen, Alemania) debajo del WE del sensor, pretratado según se detalla en la Subsección 4.5.1. Como resultado del proceso se produce la formación de un sedimento de color negro sobre la superficie del WE. En la Figura 4.5.a se muestra una imagen de SEM del compuesto de PM/NTC, donde se ven las PM-estreptavidina ($\phi = 1 \mu\text{m}$) conectadas entre sí por los NTC. Como se puede observar, los NTC forman una red que recubre la superficie de las PM y hace que las PM se conecten entre sí y con la superficie del substrato sobre el que se han depositado. Para la realización de estas imágenes, el compuesto PM/NTC se depositó en la superficie de un portaobjetos de vidrio con

la ayuda de un imán colocado debajo de él, se lavó con agua destilada para prevenir la formación de cristales de sal y se secó en una estufa a 37°C antes de su análisis con el SEM.

Tras la nanoestructuración los electrodos se caracterizan por CV en PBS y en ferrocianuro. En la Figura 4.5.b se muestra una CV realizada en PBS 10 mM usando un electrodo modificado con NTC por atrapamiento magnético, donde se ve un codo a -0,1 V vs Ag. Este codo se atribuye a los defectos oxigenados, presentes en los extremos de los NTC tratados con ácido [149, 170]. En este trabajo, la posición, altura y forma de este codo sirve para controlar lo efectivo que ha sido el conexionado del compuesto PM/NTC con la superficie del electrodo. Por ejemplo, se ha observado que cuando la CV no muestra el codo o muestra un codo desfigurado, el efecto electrocatalítico de los NTC hacia el analito que se quiera detectar empeora.

Tras la utilización del electrodo nanoestructurado, se retira el imán, se elimina el compuesto de PM/NTC por pipeteo, se realiza una activación electroquímica para eliminar las trazas del compuesto de la superficie y se lava y seca el electrodo para su reutilización.

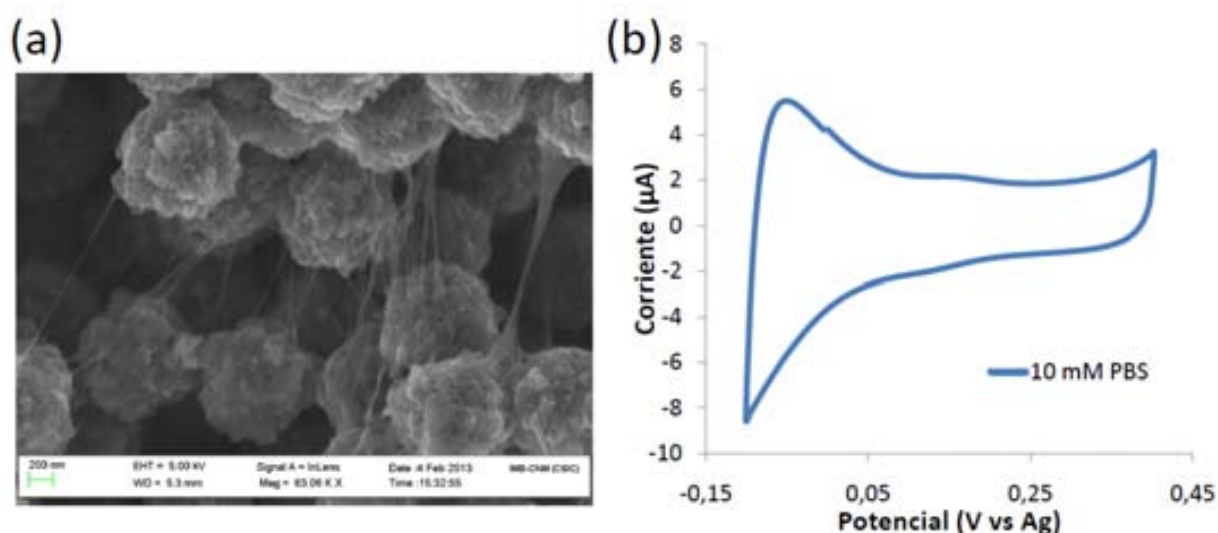


Figura 4.5.: Atrapamiento magnético de PM/NTC. (a) Imagen de SEM de PM ($\phi = 1 \mu m$) conectadas con NTC. (b) CV realizada en PBS en un sensor serigrafiado modificado con PM/NTC.

4.4. Descripción del potencióstato desarrollado en IK4-Ikerlan

En paralelo a esta tesis, dentro de la línea de investigación del departamento de Sensores de IK4-Ikerlan, se ha desarrollado un potencióstato. Este se ha diseñado con el objetivo de crear un dispositivo de detección electroquímica portátil. Aunque

hoy en día se pueden adquirir potenciostatos compactos de pequeñas dimensiones, como los comercializados por DropSens, Uniscan Instruments o Palmsens, en la literatura no se encuentran muchos potenciostatos portátiles diseñados por grupos de investigación para medidas concretas [171, 172, 173]. El potenciostato desarrollado en IK4-Ikerlan, es un equipo modular al que se pueden conectar distintos tipos de conectores para ensamblar distintos chips (Subsección 4.4.1), y que también permite el acoplamiento directo a un cartucho microfluídico (Subsección 4.4.2). De este modo, en este equipo se realizan medidas en un sensor que está integrado en el potenciostato (cápsula Au) y en un cartucho microfluídico, todos ellos diseñados y producidos también en IK4-Ikerlan (Figura 4.6).

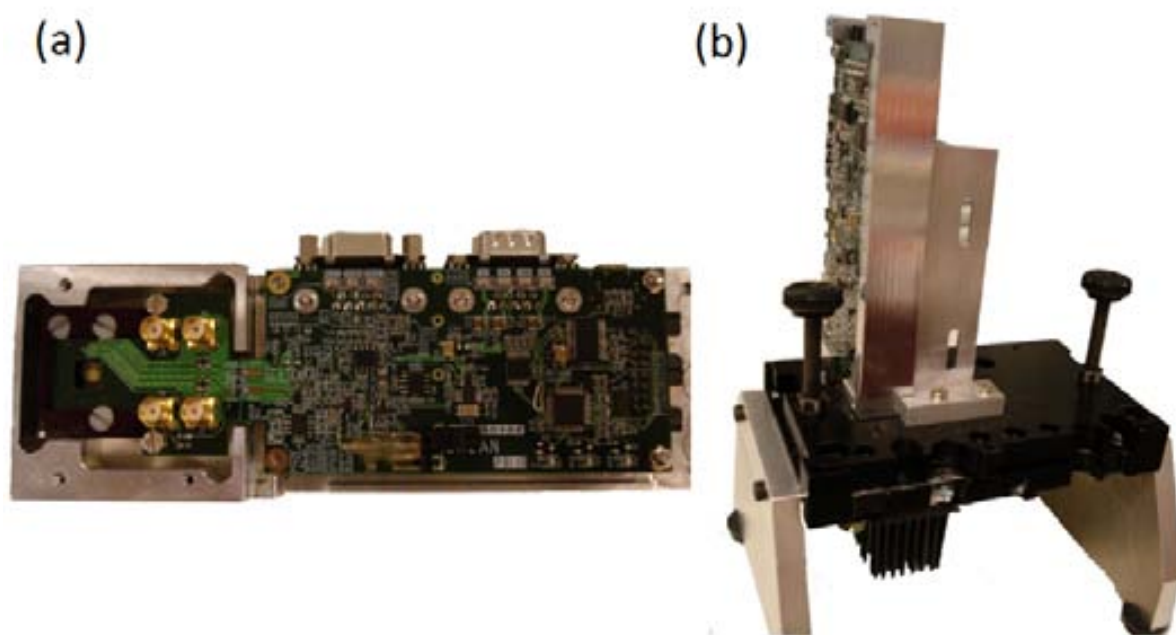


Figura 4.6.: Tarjeta de circuito impreso del potenciostato IK4-Ikerlan diseñado para (a) medidas en sensor integrado cápsula Au (en la imagen) (Subsección 4.2.2) o medidas con sensores externos; (b) medidas en cartucho micro uídico (Subsección 4.2.3).

El dispositivo desarrollado permite aplicar la consigna de excitación a la celda electroquímica de manera analógica o digital. En el primer caso se utiliza una tarjeta de adquisición (NI USB 6259) y en el segundo se utiliza un microcontrolador integrado en el potenciostato. En los dos casos, el interfaz de usuario se ha desarrollado en LabVIEW (National Instruments). Este interfaz permite elegir la técnica voltamétrica que se quiera utilizar (cronoamperometría, CV, SWV o DPV) y los parámetros de cada técnica (potencial de inicio y final, frecuencia, potencial escalón y amplitud de la consigna de excitación) (Figura 4.7).

Las medidas realizadas en este trabajo se han hecho aplicando la consigna de excitación de manera digital a la celda electroquímica. Para validar el funcionamiento

del potencioestado de IK4-Ikerlan, se han realizado medidas en paralelo en un potencioestado comercial (Autolab, PGSTAT 128N). De este modo, a lo largo de la tesis se han llevado a cabo medidas en un potencioestado Autolab, PGSTAT 128N, en el potencioestado de IK4-Ikerlan y, también, se ha utilizado un potencioestado μSTAT 400 de DropSens para realizar las medidas descritas en la Sección 6.3.

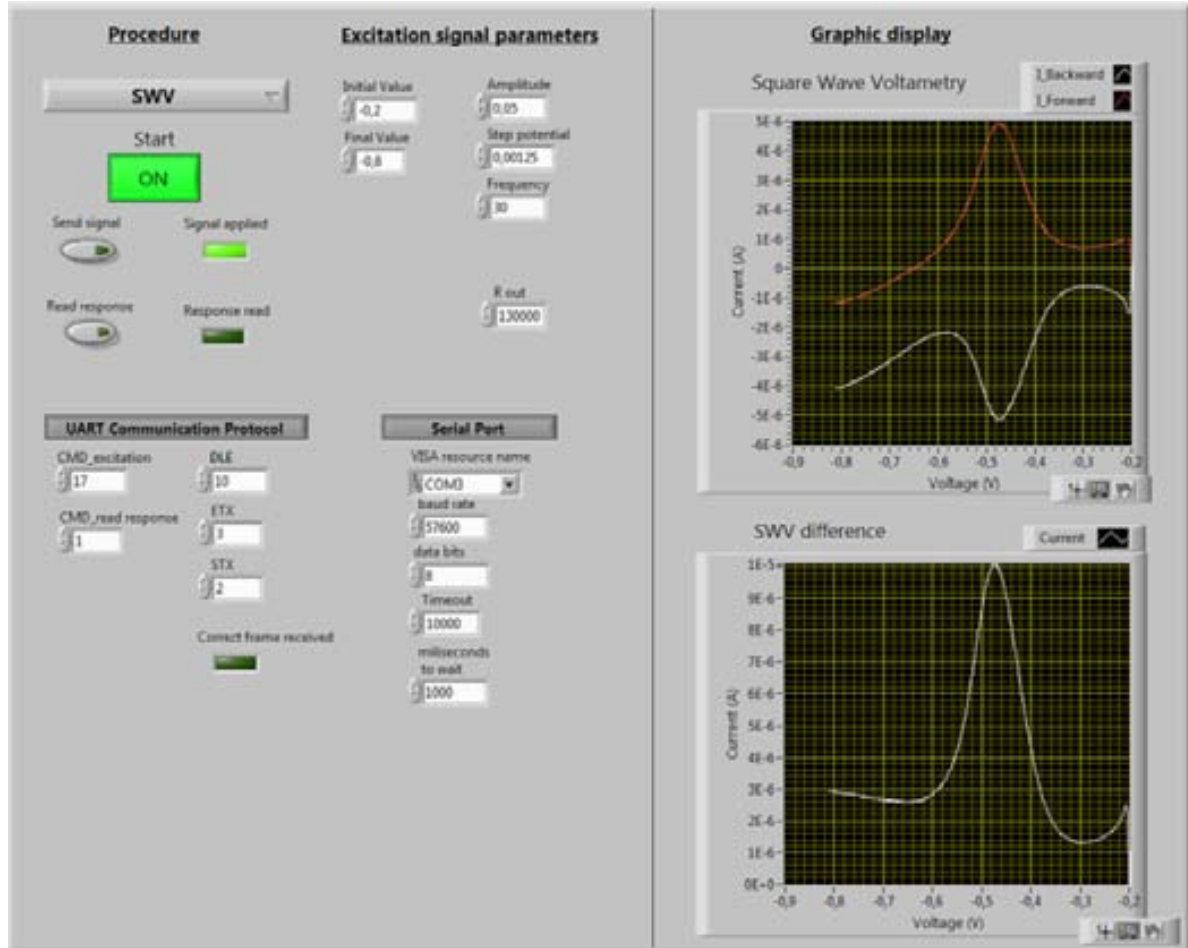


Figura 4.7.: Interface creada con LabVIEW para la gestión y análisis de datos del potencioestado desarrollado en IK4-Ikerlan. En el ejemplo de la imagen se muestran los parámetros de medida y resultados en el caso de una SWV.

4.4.1. Potencioestado para medidas en sensor

La versión del potencioestado desarrollada para realizar medidas en un sensor externo (Figura 4.6.a) está específicamente diseñada para ser utilizada con la cápsula de Au (Subsección 4.2.2 y Figura 4.2.b). Como se muestra en la Figura 4.6.a, el potencioestado incluye un módulo fabricado con resina epoxi por esterolitografía, que facilita el conexionado directo (sin cableado adicional) de la cápsula de Au con el potencioestado y disminuye el ruido en las medidas. Este dispone también de una serie de

conectores (Figura 4.6.a, a la derecha de la cápsula), que permiten la conexión del mismo con un sensor externo como, por ejemplo, el chip de Pt fabricado en esta tesis (Figura 4.2.a) o los sensores serigrafiados de DropSens (Tabla 4.4). Para la conexión del chip de Pt se ha fabricado un conector específico y el conexionado con los sensores serigrafiados se hace con un conector comercial de DropSens.

4.4.2. Potenciostato para medidas en cartucho

El potenciostato de la Figura 4.6.b está diseñado para realizar las medidas en el cartucho microfluídico. Esta tarjeta de circuito impreso tiene las mismas características y componentes que el que se utiliza para las medidas en un sensor externo (Figura 4.6.a), pero se diferencia en el tipo de conexionado con los electrodos. En este caso se realiza a través de pines especiales "spring-loaded pin" que se acoplan a los contactos (WE, RE y CE) del sensor integrado en el cartucho microfluídico (Figura 4.4). Además, se ha fabricado una plataforma mecánica en la que se introduce y sujeta el cartucho para asegurar el contacto de los pines del potenciostato con los contactos del cartucho.

4.5. Medidas electroquímicas

A menos que se detalle lo contrario, todas las medidas electroquímicas se han realizado con el electrodo colocado en posición horizontal y pipeteando entonces 20 ó 50 μL de la solución de medida sobre los electrodos de capa fina o serigrafiados, respectivamente. En el caso del cartucho microfluídico, la solución se ha inyectado usando una bomba peristáltica.

4.5.1. Activación de sensores

Antes de realizar las distintas medidas llevadas a cabo a lo largo de esta tesis, a los sensores electroquímicos presentados en la Sección 4.2, hay que aplicarles un protocolo de activación electroquímica. El mecanismo por el que actúa la activación electroquímica, que suele consistir en la aplicación de varios ciclos consecutivos de CV en medio ácido o de anodización en medio salino, no ha sido completamente aclarado. Sin embargo se acepta que en algunos tipos de electrodos su activación electroquímica mejora la detección de algunas moléculas electroactivas (por ejemplo generando alturas de pico mayores y distancias entre pico menores en la CV) y la reproducibilidad entre dispositivos (especialmente en el caso de algunos SPE). Por ejemplo, en el caso de los SPE, los dispositivos se producen por estampación de una mezcla que contiene partículas de un material conductor (como carbono), pero esta mezcla también contiene otros componentes que pueden afectar negativamente el comportamiento del electrodo. Se ha defendido que la activación electroquímica

podría contribuir a eliminar los contaminantes de la superficie, además de parte de los componentes no conductores de la pasta que compone el electrodo. De esta forma se aumentaría la rugosidad y el área activa del electrodo, así como la proporción de partículas de material conductor expuestas al medio [174]. Para los macroelectrodos de grafito, carbono y carbón vítreo se ha descrito un efecto similar, en el que la activación electroquímica aumentaría la porosidad superficial y área activa del dispositivo, incorporaría grupos funcionales y contribuiría a eliminar contaminantes potencialmente adsorbidos sobre la superficie [175, 176].

El protocolo de activación de los sensores utilizado en este trabajo es siempre electroquímico, pero es distinto dependiendo del material del WE. Los SPE con WE de carbono se activan en PBS 10 *mM* aplicando un pulso de 100 s a 1,4 V vs Ag. Los sensores de capa fina y SPE con WE de oro se activan mediante la aplicación de 15 barridos de CV en H₂SO₄ 50 *mM* entre 0 - 1,4 V vs Ag a 100 *mV s*⁻¹. Los sensores de capa fina y SPE con WE de platino, se activan con la aplicación de 3 pulsos consecutivos de 5 segundos de duración en PBS 10 *mM*, a -1,4 V, 0 V y 1,4 V vs Pt. Finalmente, los SPE de carbono modificados con nanopartículas de Au (AuNP-SPE, Ref. 110-GNP) y con MWCNT (MWCNT-SPE, Ref. 110CNT) no necesitan ser activados antes de las medidas.

4.5.2. Comprobación del funcionamiento de los sensores

Con el objetivo de disponer de sensores reproducibles para las medidas, después de la activación del sensor se realiza una caracterización de los dispositivos por voltametría cíclica en ferrocianuro 5 *mM*, con una velocidad de barrido de 50 *mV s*⁻¹. Esta caracterización del sensor permitirá controlar que el sensor que vamos a utilizar en las medidas funciona correctamente. Adicionalmente, los resultados de esta caracterización permiten estimar el comportamiento del electrodo (separación entre pico de oxidación y reducción lo más pequeña posible) y el área activa de cada electrodo aplicando la ecuación de Randles-Sevcik a temperatura ambiente (Ecuación 3.7). De esta forma se pueden eliminar aquellos electrodos que no presenten un comportamiento similar al promedio.

4.5.3. Voltametrías

En esta sección, se mencionará brevemente cuándo y para qué se han aplicado las técnicas voltamétricas, que ya han sido descritas más extensamente en la Subsección 3.4.2. Como ya se ha comentado anteriormente, las medidas voltamétricas se han obtenido con 3 potenciostatos diferentes: un Autolab PGSTAT 128N, el potenciostato IK4-Ikerlan y un potenciostato μ STAT 400 de Dropsens. Las alturas de pico se calcularon usando el software de cada uno de los equipos comerciales (NOVA 1.8 y DropView 2.0). En el caso del potenciostato IK4-Ikerlan se ha utilizado el interface desarrollado en LabVIEW 2012.

El equipo y los parámetros de medida utilizados en cada serie de experimentos o aplicación se detallarán en las secciones correspondientes de los capítulos 5-8.

- *Voltametría cíclica (CV)*. Se utiliza para caracterizar el comportamiento electroquímico de los electrodos, tanto cuando están sin modificar, como cuando se modifican con PM/NTC. Para ello, se realizan CVs en ferrocianuro 5 mM y se analiza si el sensor está activado y si tiene un comportamiento reproducible. Además, como se ha mostrado en la Figura 4.5, la CV en PBS 10 mM sirve para controlar si el conexionado de los NTC con las PM y con la superficie del electrodo ha sido eficiente.

La CV se puede aplicar también para la detección de analitos electroactivos. En este trabajo se utiliza para la detección electroquímica de analitos como la dopamina (Sección 6.2) y el ácido úrico (Sección 7.3) y para la detección electroquímica de nanocristales de CdS usados como marcador no-enzimático (Sección 6.3).

- *Voltametría de pulso diferencial (DPV)*. Se ha utilizado en las medidas de detección electroquímica del Hoechst 33258, un agente intercalante que se ha empleado como marcador electroactivo para la detección de ADN (Capítulo 5), y en las medidas de detección de dianas no electroactivas mediante el conexionado de los NTC a las PM-Fc, en que se han realizado DPVs en PBS 10 mM (Sección 7.4).
- *Voltametría de onda cuadrada (SWV)*. La SWV se ha utilizado para la detección del azul de metileno, un agente intercalante utilizado como marcador electroactivo en las medidas de ADN (Capítulo 5).

4.5.4. Espectroscopía de impedancia (EIS)

La EIS se ha utilizado para caracterizar la superficie de los sensores. Para ello, se han hecho medidas en ferrocianuro 5 mM antes y después de la modificación de la superficie con PM/NTC (Capítulo 7). A menos que en el texto se detalle lo contrario, la EIS se ha llevado a cabo en el rango de frecuencias 0.1 Hz-100 kHz, aplicando un potencial de excitación de 10 mV, a un potencial de 0 V.

La EIS también se ha utilizado para analizar el efecto del detergente en el sombreado de las PM-Fc (Sección 7.4). En este caso se han obtenido espectros de EIS tanto en ferrocianuro como en PBS.

Todas las medidas de EIS se han hecho en un equipo Autolab PGSTAT 128 N (Eco Chemie). El ajuste de los datos obtenidos se ha realizado usando el programa NOVA 1.8 (Eco Chemie) y ajustando los datos al circuito de Nyquist que se muestra en la Figura 3.28.

4.5.5. Cronoamperometría

La cronoamperometría se ha utilizado para monitorizar la actividad enzimática de la mieloperoxidasa usando como sustrato enzimático soluciones comerciales TMB y H₂O₂ "listas para usar" (Sección 6.4). Para estas medidas se procedía a la inmunocaptura de la MPO usando PM-antiMPO. Tras los lavados correspondientes, las PM-MPO se confinaban magnéticamente sobre la superficie de un C-SPE. A continuación se depositaban 50 μ L de PBS sobre el sensor y se ponía en marcha la medida a 0 V vs Ag durante 400 segundos. Tras pausar la medida se sustituía el PBS por la solución de sustrato enzimático y se continuaba la medida otros 400 segundos. El incremento de corriente registrado para cada concentración de MPO (I) se calculaba entonces sustrayendo la corriente registrada tras la estabilización en TMB ($t = 800$ s) de la corriente medida tras la estabilización en PBS ($t = 400$ s).

4.6. Análisis de datos

Para el cálculo de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de los distintos ensayos llevados a cabo en esta tesis, se calculó el promedio de al menos 3 medidas del blanco (μ), en que se llevaba a cabo el ensayo completo en ausencia del analito, y su desviación estándar (σ). De este modo, el LOD = $\mu + 3\sigma$ y el LOQ = $\mu + 10\sigma$.

La variabilidad de los ensayos se calculó mediante el coeficiente de variación (% CV = $(\sigma / \mu) \cdot 100$).

5. Desarrollo de un sistema de detección electroquímica portable. Aplicación a la detección de ADN.

En este trabajo se ha desarrollado un sistema de detección electroquímica, con el objetivo de simplificar y reducir el coste de un dispositivo Lab on a Chip (LOC), que previamente se había producido en IK4-Ikerlan para la detección óptica del ADN [177]. Como se ha comentado en la Sección 3.3, los criterios más importantes que tienen que cumplir los dispositivos LOC son portabilidad, tiempo de medida corto y coste por ensayo reducido. El transductor que mejor cumple con estos requisitos es el electroquímico [4]. Por este motivo se ha trabajado con un LOC con detector óptico preexistente [178] y, para facilitar su portabilidad, se le ha añadido un módulo de detección electroquímica. En la Figura 5.1, se detallan los pasos seguidos para la implementación del módulo electroquímico. El equipo obtenido se ha aplicado inicialmente a la detección de ADN. Estos resultados han sido publicados en *Sensors and Actuators B* ([179] y Subsubsección A.2.1.1).

Para el desarrollo de un sistema apropiado de detección electroquímica del ADN, se ha trabajado, en primer lugar, en la búsqueda del mejor método de detección electroquímica del ADN. Como se ha mencionado en la Subsección 3.1.2, el ADN es una molécula electroactiva en sí misma. Sin embargo, su detección electroquímica directa sin marcador no es trivial, ya que los ácidos nucleicos se oxidan y reducen a potenciales demasiado altos para la mayoría de los electrodos. Por ello, es habitual utilizar agentes intercalantes electroactivos como marcador para su detección indirecta. En nuestro caso, se han utilizado el azul de metileno (MB) y el Hoechst 33258. El ADN utilizado en este trabajo para el calibrado del sensor y para comprobar el funcionamiento del sistema de detección es un oligómero sintético de 126 bases. Este ADN tiene un contenido bajo (30 %) de guaninas y citosinas. En el caso del MB, este se une preferencialmente a la guanina [180]. Por lo tanto, se consideró que si el método de detección desarrollado con MB era capaz de detectar una secuencia de ADN con bajo contenido en guaninas, sería también aplicable a la detección de muestras de ADN de diversas secuencias.

La optimización inicial de la detección electroquímica de los agentes intercalantes electroactivos, a lo largo de la que se ha elegido la técnica voltamétrica más adecuada y se han optimizado los parámetros de medida, se ha llevado a cabo en un potenciostato comercial Autolab PGSTAT 128N. A continuación, se ha tratado de

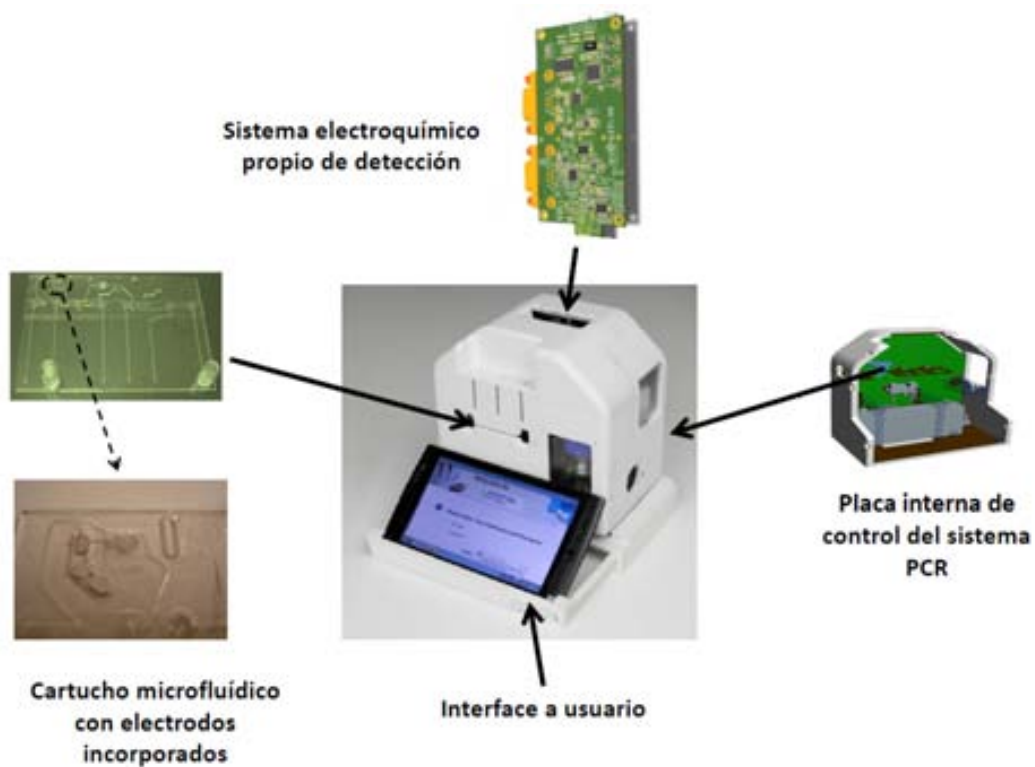


Figura 5.1.: Esquema del dispositivo LOC con el módulo de detección electroquímica, donde se detallan los elementos añadidos.

conseguir un dispositivo de bajo coste que satisfaga las necesidades específicas de la detección de ADN mediante la cuantificación electroquímica del intercalante correspondiente. Para ello, se ha modificado un equipo pre-existente y se ha desarrollado un potencióstato (Figura 4.6), que incorpora todos los aspectos que se requieren para la aplicación concreta que se persigue: la creación de la señal de excitación de la muestra, la electrónica de acondicionamiento de señales, la adquisición de los datos de respuestas del analito y el tratamiento de datos necesario, para proporcionar una medida de la concentración de ADN presente en la muestra. En paralelo, se ha diseñado un cartucho microfluídico de bajo coste, que se ha producido en materiales plásticos. Este cartucho incluye cámaras interconectadas para la amplificación por PCR, marcado con un agente intercalante y detección electroquímica de ADN. Todo el conjunto se controla mediante un interfaz LabVIEW PC-Microcontrolador, (Figura 4.7), donde se pueden elegir los parámetros de la señal de excitación y ver la evolución de las medidas obtenidas.

Finalmente, también se hicieron unas pruebas preliminares de detección de ADN que, previamente, había sido amplificada mediante el proceso PCR en la cámara de PCR del cartucho microfluídico [178]. De este modo, un producto de 72 pares de bases se amplificó del gen humano RNasa P con el cebador directo (5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3') e inverso (5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-

3'). El protocolo de amplificación es el siguiente: para la desnaturalización inicial, se mantiene una $T = 95^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos y para la PCR, se repite el proceso (5 segundos a $T = 95^{\circ}\text{C}$ y 20 segundos a $T = 60^{\circ}\text{C}$) 40 veces. En este trabajo no se muestran los resultados de estas pruebas.

5.1. Detección electroquímica del ADN

En estos experimentos la detección electroquímica del ADN se realiza en solución. Por lo tanto, no se necesita una modificación previa del sensor, lo que simplifica el ensayo y permite la reutilización del electrodo. Por otra parte, que el sensor no tenga que ser previamente modificado facilita también la posterior integración, reutilización y mantenimiento del sensor en el cartucho microfluídico. La detección electroquímica se realiza mediante la incubación del ADN con un agente intercalante, que es entonces usado como marcador electroquímico.

5.1.1. Detección de ADN mediante MB

Como se ha descrito en la Subsección 3.1.2, el MB se intercala en la doble hebra de ADN. La interacción entre el MB y el ADN se produce debido a dos procesos [78]. Por un lado, la interacción electrostática entre las moléculas del MB, cargadas positivamente a pH neutro, y los grupos fosfato del ADN, cargados negativamente en esas mismas condiciones. Por otro lado, la intercalación del anillo aromático del MB entre pares de bases, donde la inserción del MB entre dos pares de bases consecutivas de ADN se realiza debido a interacciones favorables. Estos procesos producen una disminución del MB libre en la muestra a medida que aumenta la concentración de ADN en la misma, lo que se traduce en una disminución de la corriente del pico de reducción generado por el MB (Figura 5.2).

Para este trabajo se ha empezado por comparar la eficiencia de distintas técnicas voltamétricas para seleccionar la que genera más sensibilidad en la detección electroquímica del MB. Para realizar estas medidas se ha utilizado un potenciostato comercial, Autolab PGSTAT 128N, y un sensor microfabricado en la sala blanca de IK4-Ikerlan (Subsección 4.2.2) que incluye un electrodo de trabajo de Au y electrodo de referencia y contraelectrodo de Pt (Tabla 4.4; cápsula Au) (Figura 5.3). El tamaño y la geometría de los electrodos de este sensor son los mismos que los del dispositivo que irá integrado en el cartucho.

Se llegó a la conclusión de que las técnicas que mayores sensibilidades proporcionaban eran la voltametría de pulso diferencial (DPV) y la voltametría de onda cuadrada (SWV). Sin embargo, para todas las concentraciones de MB analizadas, comparando en profundidad la DPV y la SWV, la SWV genera picos más altos. Es sabido que la SWV es una técnica que ofrece alta sensibilidad, rapidez de medida y

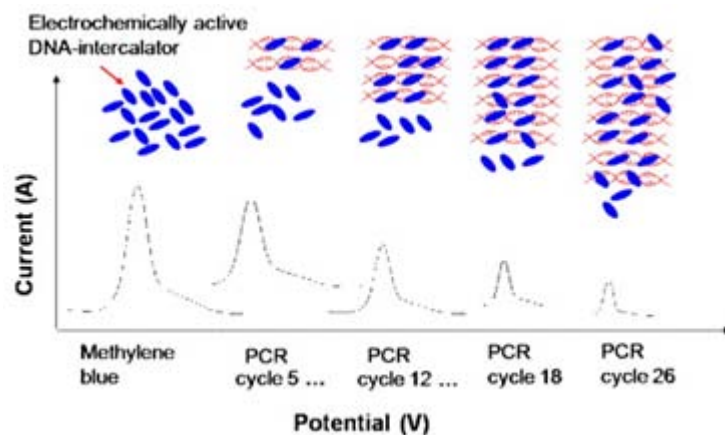


Figura 5.2.: Esquema de la intercalación del MB en la doble hebra de ADN y representación de la disminución del pico de reducción del MB a medida que aumenta la cantidad de ADN en la muestra [60].

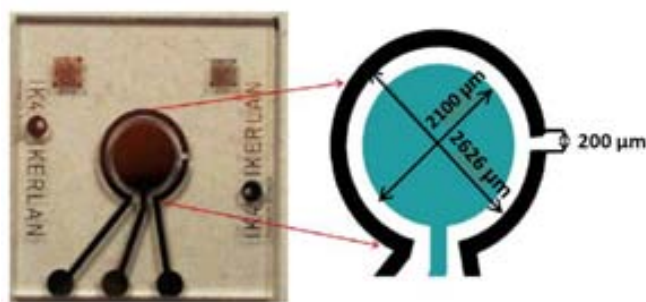


Figura 5.3.: Sensor (cápsula Au) que se utiliza en las medidas de ADN. Se trata de un dispositivo producido por microfabricación e incluye un electrodo de trabajo de oro y electrodos auxiliar y referencia de platino.

unos límites de detección (LOD) bajos (Subsección 3.4.2). A continuación se optimizaron los parámetros de medida de la SWV. Los mejores resultados se obtuvieron para un salto de potencial (E_p) de 1,25 mV y una amplitud (E_{sw}) de 50 mV. Con estos dos parámetros fijos se modificó la frecuencia de la señal de excitación entre 10 Hz y 90 Hz y se analizó el pico de reducción del MB. Como se observa en la Figura 5.4.a, cuanto mayor es la frecuencia de excitación de la SWV, mayor es el pico obtenido, pero la variabilidad de las medidas también aumenta. Por lo tanto, se decidió que la frecuencia que proporcionaba el mejor compromiso entre más corriente y menos variabilidad era 30 Hz.

Una vez optimizados los parámetros de la SWV, se analizó la variabilidad del sensor al medir distintas concentraciones de MB preparadas en 10 mM PBS (Figura 5.4.b). El coeficiente de variación (% CV) obtenido para todas las concentraciones analizadas es inferior al 10%. A pesar de ello, la detección de ADN se llevó a cabo usando una concentración de MB de 20 μM. El motivo fue que concentraciones más altas de MB

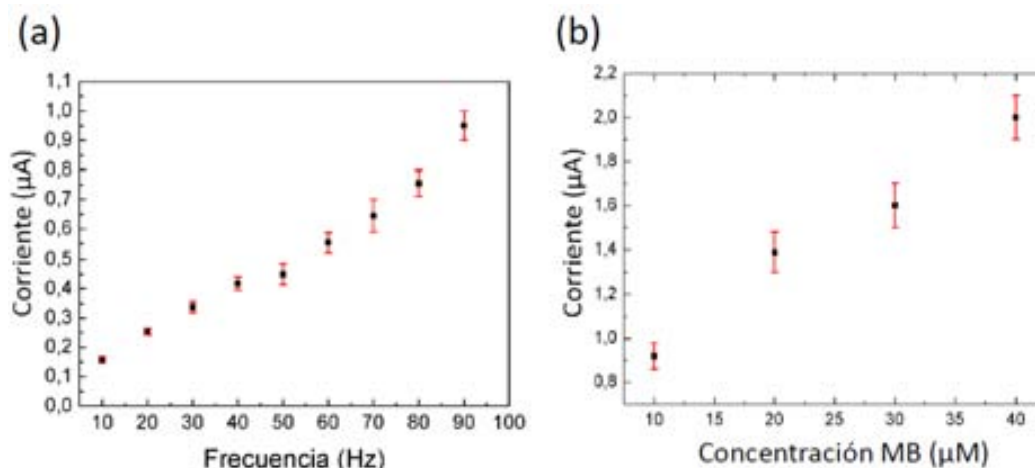


Figura 5.4.: (a) Efecto de la frecuencia de la onda cuadrada en la detección de MB 20 μM por SWV. (b) SWV realizadas a 30 Hz en distintas concentraciones de MB.

generaban corrientes de fondo demasiado elevadas. Como consecuencia, solamente concentraciones muy elevadas de ADN producían una disminución medible en el pico de MB, lo cual revertiría negativamente en el LOD del ensayo.

Para finalizar, se aplicó el protocolo optimizado a la detección de distintas concentraciones de un oligómero de ADN. Estas medidas se hicieron con MB 20 μM y aplicando una consigna de excitación de 30 Hz, entre -0,8 V y -0,2 V vs Pt. Como se ha ilustrado en la Figura 5.2, a medida que aumenta la concentración de ADN en la muestra, mayor es la proporción de MB que se intercala en la doble hebra de ADN y menor la cantidad de MB libre en solución. De acuerdo con esto, la SWV generará un pico de reducción, atribuible al MB libre en solución, que es inversamente proporcional a la concentración de ADN presente en la muestra (Figura 5.5).

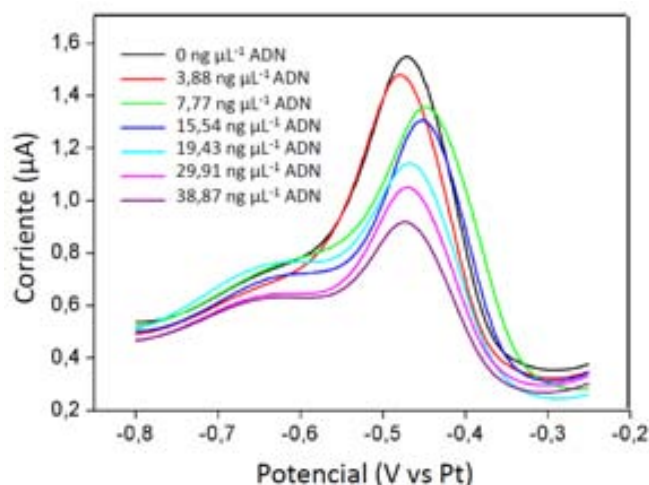


Figura 5.5.: SWVs de 20 μM MB realizadas con distintas concentraciones de ADN en AUTOLAB.

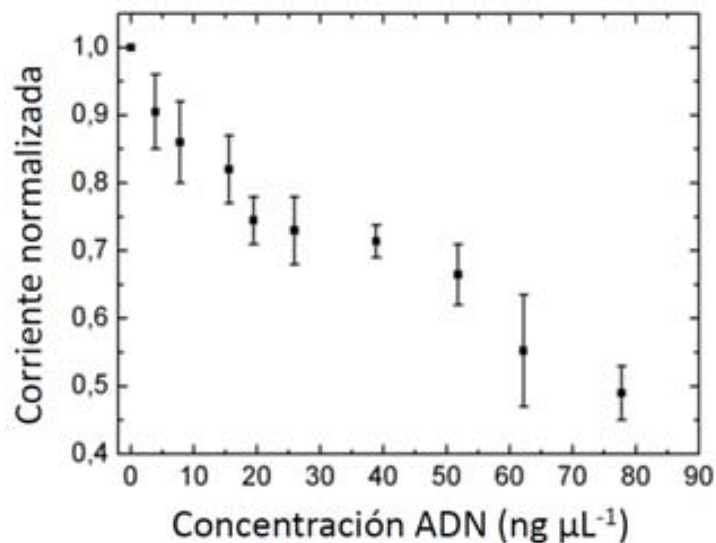


Figura 5.6.: Detección de concentraciones crecientes de dhADN usando MB como marcador intercalante electroactivo. Se realizaron 4 medidas independientes para cada concentración de ADN y los picos de oxidación obtenidos se normalizaron respecto del pico de oxidación obtenido por MB 20 μM en ausencia de la dhADN.

Concentración ADN ($ng \mu L^{-1}$)	Normalización	Desviación	% CV
0	1		
3,88	0,90	0,05	6,07
7,77	0,86	0,06	6,98
15,54	0,82	0,05	6,10
19,43	0,74	0,03	4,70
25,91	0,73	0,05	6,85
38,87	0,71	0,02	3,36
51,82	0,66	0,04	6,77
62,19	0,55	0,08	14,84
77,73	0,49	0,04	8,16

Tabla 5.1.: Resumen de medias y coeficientes de variación de las medidas de distintas concentraciones de ADN.

Para demostrar la reproducibilidad del método de detección, se realizaron 4 medidas independientes para cada concentración de ADN. Como se puede ver en la Figura 5.6 y en la Tabla 5.1, el pico del MB disminuye sistemáticamente a medida que aumenta la concentración de ADN entre 3,8 y 77 $ng \mu L^{-1}$, con una variabilidad entre réplicas inferior al 10 % para la mayoría de las concentraciones de ADN ensayadas. En la Tabla 5.1 se muestran los valores obtenidos. Este método de detección no permite la cuantificación exacta del ADN que se encuentra en la muestra, ya que

concentraciones de 3,8 a 20 $ng \mu L^{-1}$ de ADN generan disminuciones del pico de reducción del MB que se solapan, al igual que concentraciones de ADN de 20 a 60 $ng \mu L^{-1}$ y superiores a 60 $ng \mu L^{-1}$ de ADN. Sin embargo, sí permite saber si hay ADN en la muestra, es decir, hacer una medida cualitativa. El LOD de este ensayo es de 4 $ng \mu L^{-1}$ de ADN, que resulta lo suficientemente bajo para la detección de amplicones de PCR en el sistema LOC en el que se va a implementar.

5.1.2. Detección de ADN mediante Hoechst 33258

El Hoechst 33258 es un intercalador de ácidos nucleicos que se une al surco menor de la doble hebra de ADN. Por lo tanto, y como ocurre en el caso del MB, cuando aumenta la concentración de ADN en solución, el Hoechst interacciona con el mismo. Como consecuencia, la concentración de Hoechst libre en solución disminuye de forma inversamente proporcional a la concentración de ADN [66].

Primeramente, se examinó cual era la técnica electroquímica más apropiada para la detección de Hoechst. En este caso, la DPV daba mejores resultados que la SWV. Para la detección de ADN usando Hoechst, se utilizaron los parámetros optimizados por Tamiya et al. [64], que son potencial escalón ($E_s = 4 mV$), amplitud ($E_p = 50 mV$), duración del pulso ($t_{pulse} = 0,20 s$) y una velocidad de barrido de ($\nu = 10 mV s^{-1}$) aplicando el barrido entre 0 - 0,4 V vs Pt. En la Tabla 5.2 se pueden ver las alturas de pico obtenidas para distintas concentraciones de Hoechst. Analizando estos datos se decidió utilizar 50 μM de Hoechst para hacer las medidas de detección de ADN, ya que era la concentración que generaba los picos más altos. A partir de 50 μM de Hoechst el pico no aumenta mucho, posiblemente porque el sensor se satura.

Hoechst (μM)	I (μA)	% CV
1	1,95	26,2
5	23	3,7
10	36,15	20,1
20	65,71	5,4
30	67,8	11,9
40	107,02	17,1
50	132,95	10,0
60	129,26	8,1
70	122,57	2,7

Tabla 5.2.: Picos de oxidación generados por concentraciones crecientes de Hoechst y coeficientes de variación obtenidos en 3 DPVs independientes para cada concentración, realizadas en cápsula Au.

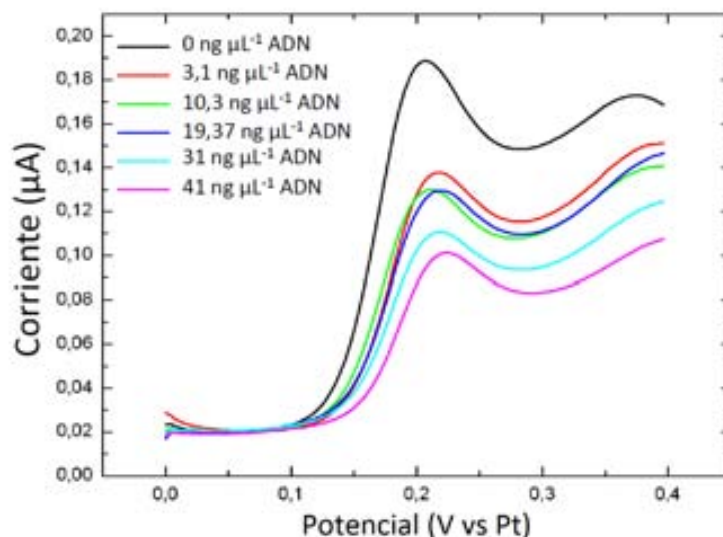


Figura 5.7.: DPVs obtenidas con Hoechst 33258 $50 \mu M$ en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de ADN.

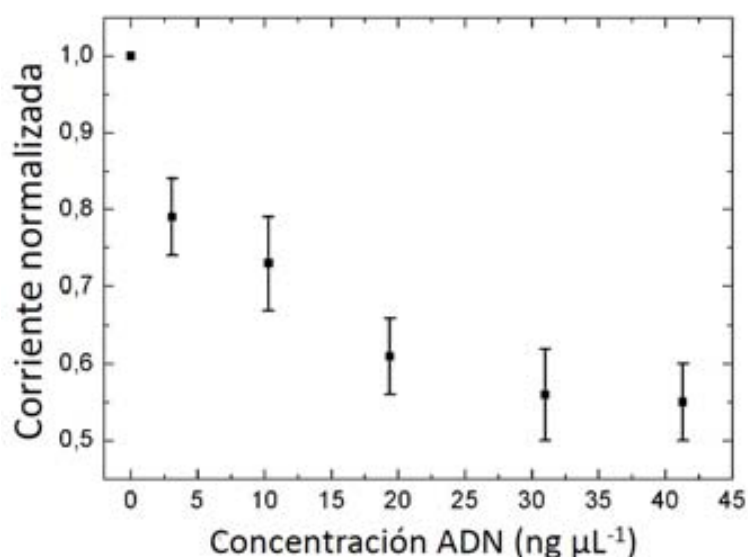


Figura 5.8.: Curva de calibración de distintas concentraciones de ADN utilizando Hoechst 33258 como marcador.

En la Figura 5.7 se pueden ver algunos ejemplos de las DPVs realizadas con Hoechst 33258 $50 \mu M$ en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de ADN. Si comparamos estos resultados con los de la Figura 5.5, donde se veían las SWV obtenidas con MB $20 \mu M$ en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de ADN, se puede observar como en ambos casos el pico del intercalador disminuye a medida que aumenta la concentración de ADN en la muestra. Sin embargo, aunque

las concentraciones bajas de ADN generan una disminución del pico mayor con el Hoechst, se obtiene una mejor resolución de las distintas concentraciones de ADN con el MB. Así en el caso del Hoechst, concentraciones superiores a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN, generan disminuciones de la altura del pico de oxidación del Hoechst superiores al 65 %, pero la altura del pico no disminuye significativamente a partir de esta concentración (Figura 5.8). La reproducibilidad de las medidas se puede observar en las curvas de calibración obtenidas para el MB y Hoechst que se muestran en la Figura 5.6 y Figura 5.8, respectivamente. Los valores en las ordenadas (Y) de estas dos gráficas de calibración se han obtenido normalizando las alturas de pico de oxidación obtenidas en las voltametrías respecto al pico medido para una solución sin ADN. Las medidas para cada concentración de ADN se han realizado 4 veces en soluciones distintas, obteniendo un coeficiente de variación ($\% \text{ CV} < 10$) para todas las concentraciones de ADN analizadas.

5.1.3. Detección electroquímica de ADN usando electrodos modificados con NTC

Con el objetivo de mejorar la detección electroquímica de ADN respecto de las medidas de la Subsección 5.1.1 y Subsección 5.1.2, se repitieron las mismas usando esta vez electrodos nanoestructurados. Para ello, como se detalló en la Sección 4.3, se realiza la modificación reversible del electrodo de trabajo mediante el conexionado de PM con NTC y el subsiguiente atrapamiento magnético del compuesto PM/NTC sobre la superficie del electrodo de trabajo con la ayuda de un imán.

La nanoestructuración de la superficie del electrodo de trabajo no se hizo en el sensor microfabricado de la Figura 5.3, sino que para ello se utilizó un electrodo serigrafado de Au-SPE ($\phi = 1,6 \text{ mm}$; Tabla 4.4). Esto fue debido a que cuando se hicieron estas medidas, todavía no se había analizado y caracterizado la nanoestructuración de electrodos de capa fina.

La detección electroquímica del MB usando electrodos modificados con NTC ha sido repetidamente descrita por otros grupos [181, 182]. Sin embargo, la detección óptima del MB sobre este tipo de dispositivos suele obtenerse tras la adsorción del MB en la superficie modificada con NTC, que se produce tras la inmersión extensiva del electrodo en una solución de MB. En general, el objetivo de estos trabajos no es la detección del MB en sí mismo, sino la creación de un compuesto MB/NTC para modificar la superficie del sensor, que permite mejorar la sensibilidad en la detección simultánea de distintos analitos (como por ejemplo, el ácido úrico, la dopamina y el ácido ascórbico) [183]. En nuestro caso, la necesidad de incubar el MB en la superficie de los NTC para su detección es un inconveniente ya que pretendemos desarrollar un sistema de detección rápido. Por este motivo, en estos experimentos se midió la solución del MB directamente tras modificar la superficie con PM/NTC y depositar la gota de este intercalador encima del electrodo de trabajo nanoestructurado. Como se puede observar en la Figura 5.9, en estas condiciones el MB genera un pico de

reducción a $-0,42$ V vs Ag, que se acopla parcialmente al codo generado por los NTC carboxilados alrededor de $-0,2$ V vs Ag. Debido a la gran corriente de fondo generada por los NTC, el MB no genera picos medibles a concentraciones por debajo de $40 \mu\text{M}$ de MB. Por lo tanto, la corriente de fondo generada por los NTC contribuye a enmascarar el pico de reducción del MB e impide la detección de ADN usando este agente intercalante como marcador electroquímico.

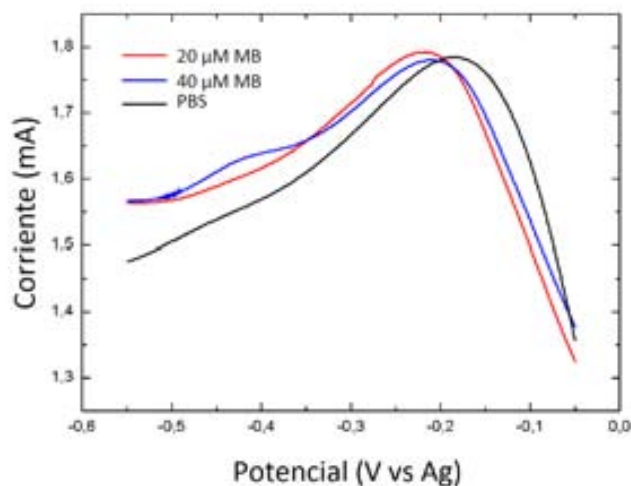


Figura 5.9.: SWV de PBS, 20 y $40 \mu\text{M}$ MB realizadas en sensores nanoestructurados con PM/NTC.

Después de hacer este análisis, se vio que solo la nanoestructuración de la superficie del electrodo con NTC no generaba una mejora en la sensibilidad del ensayo. Ya se avanzó en la Subsección 3.2.2 como la modificación de la superficie con NTC no siempre generaba una mejora en la sensibilidad de los ensayos de detección. Además, el LOD obtenido al medir con MB en sensores de Au ($4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN) era lo suficientemente sensible para la detección eficaz de amplicones de PCR. Por lo tanto, se decidió no modificar la superficie con NTC para las medidas de ADN teniendo en cuenta que para la integración del ensayo electroquímico en el cartucho microfluídico convenía tener un ensayo lo más sencillo posible.

5.2. Medidas en potenciostato diseñado en IK4-Ikerlan

El siguiente paso fue la verificación del funcionamiento del potenciostato diseñado en IK4-Ikerlan (Figura 4.6.a). Para ello, se repitieron las medidas electroquímicas del ADN, previamente optimizadas en un potenciostato comercial, usando MB como marcador. Las medidas se han hecho utilizando el mismo sensor (cápsula Au) que se ha utilizado en las medidas realizadas con el potenciostato comercial Autolab PGSTAT 128N (Figura 5.3). En la Figura 5.10 se muestran algunos ejemplos de las SWV obtenidas en $20 \mu M$ de MB en presencia de distintas concentraciones de ADN, donde se han utilizado los mismos parámetros de detección que en las medidas llevadas a cabo en el Autolab PGSTAT 128N.

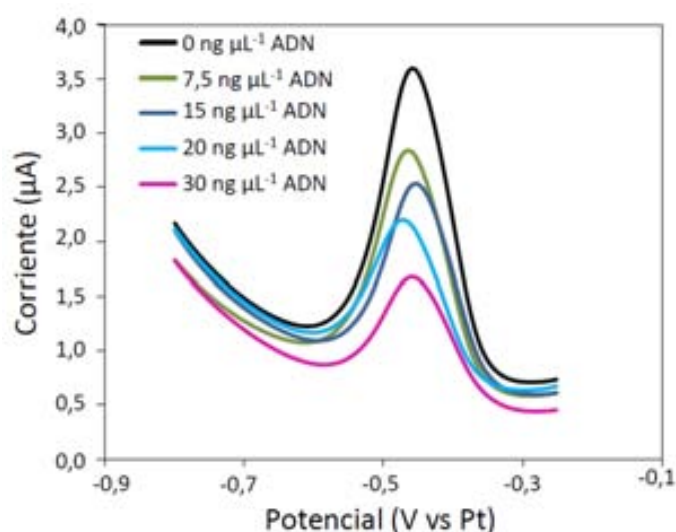


Figura 5.10.: SWVs de $20 \mu M$ de MB con distintas concentraciones de ADN realizadas con el potenciostato de IK4-Ikerlan.

El LOD ($\mu - 3$) obtenido para las medidas de ADN con el MB utilizando el potenciostato IK4-Ikerlan es de $1,36 ng \mu L^{-1}$, equivalente a $35,38 nM$, y el LOQ ($\mu - 10$) es de $4,46 ng \mu L^{-1}$, que equivale a una concentración de $115,26 nM$ (Figura 5.11). Estos valores son ligeramente mejores que los obtenidos previamente en el potenciostato comercial ($LOD = 4 ng \mu L^{-1}$) indicando que el equipo portátil producido en IK4-Ikerlan es capaz de generar resultados comparables a los de un equipo comercial, caracterizado por tamaño y precio superiores. Por otra parte, si comparamos este LOD con los que se han obtenido previamente en la literatura para la detección electroquímica del ADN en solución usando el MB, el sensor de Pt que utilizan Fang et al. [60], donde realizan la detección electroquímica del ADN después de amplificarlo por PCR, mide $10 \mu g \mu L^{-1}$ ADN; y el sistema propuesto por Castaño-Álvarez et al. [184], tiene un LOD de $4 ng \mu L^{-1}$. Por lo tanto, el sistema de detección propuesto en este trabajo, obtiene un LOD y LOQ suficientemente sensibles, utilizando un

potenciostato portable desarrollado en IK4-Ikerlan y unos sensores microfabricados en la sala blanca de este mismo centro tecnológico.

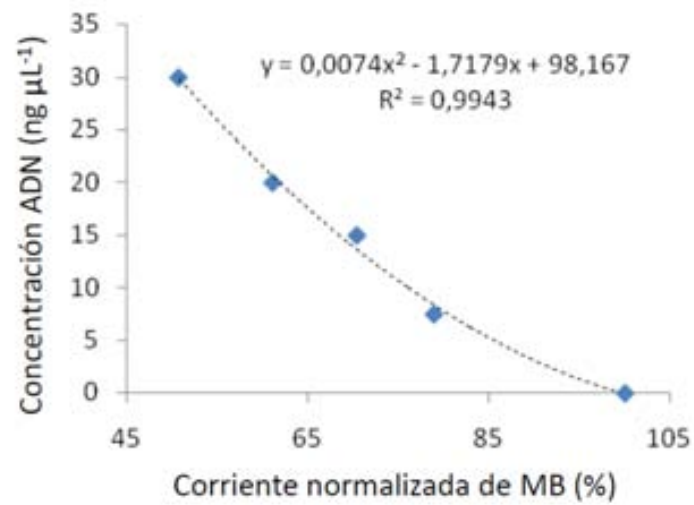


Figura 5.11.: Curva de calibración obtenida para la detección de concentraciones crecientes de ADN usando MB como marcador y el potenciostato producido en IK4-Ikerlan para realizar las SWVs.

5.3. Detección electroquímica del ADN mediante el azul de metileno en cartucho micro uídico

El último paso en el proceso de integración de las medidas electroquímicas del ADN en el dispositivo LOC fue la realización de las medidas del MB dentro del cartucho microfluídico (Figura 4.4) y usando el potenciostato diseñado en IK4-Ikerlan (Figura 4.6.b). Las SWVs obtenidas se muestran en la Figura 5.12, donde se puede ver como a medida que aumenta la concentración de ADN disminuye el pico del MB, del mismo modo que ocurría en las medidas realizadas anteriormente con el potenciostato comercial y con el potenciostato de IK4-Ikerlan, midiendo en los sensores microfabricados.

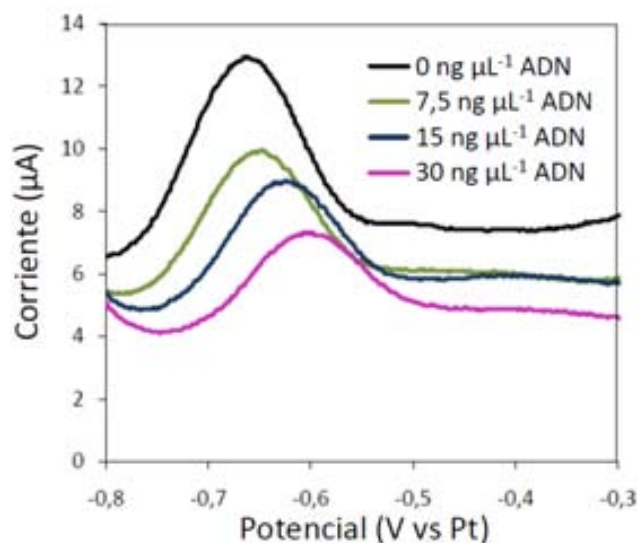


Figura 5.12.: SWVs de 20 μM de MB con distintas concentraciones de ADN realizadas con el potenciostato de IK4-Ikerlan, usando esta vez el sensor integrado dentro del cartucho micro uídico.

Concentración ADN (ng μL ⁻¹)	Disminución de señal	
	Cartucho	Cápsula
0	1	1
7,5	0,75	0,73
15	0,65	0,61
31	0,54	0,34

Tabla 5.3.: Valores normalizados para distintas concentraciones de ADN medidas con el potenciostato de IK4-Ikerlan, usando alternativamente el sensor integrado en el cartucho micro uídico (Cartucho; Figura 5.12) y el sensor microfabricado (cápsula Au; Figura 5.10).

La Tabla 5.3 muestra una comparación entre las medidas obtenidas utilizando un sensor microfabricado y un sensor integrado en el cartucho microfluídico, usando en ambos casos el potencióstato de IK4-Ikerlan. Los dos sensores tienen la misma geometría y las mismas dimensiones, pero el WE del sensor microfabricado es de Au y el del sensor integrado en el cartucho microfluídico de Pt.

5.4. Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema de detección electroquímica portable que se ha aplicado a la detección de ADN. Tras realizar la optimización del ensayo en un sensor externo, se ha integrado el sistema de detección electroquímica en un cartucho microfluídico, generando un dispositivo simple, barato y portable. La detección electroquímica del ADN se realiza siguiendo un procedimiento rápido y sencillo, consiguiendo un LOD de $1.36 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN. Como no se realiza una inmovilización previa de la hebra de ADN, este es un sistema de detección genérico que se puede aplicar a una gran variedad de ensayos biológicos.

Con el objetivo de mejorar el LOD del sistema, se ha procedido a la nanoestructuración del sensor, pero debido a la corriente de fondo generada por los NTC carboxilados no se han conseguido los resultados esperados. A pesar de ello, el LOD alcanzado por el sensor sin nanoestructurar es lo suficientemente sensible para la aplicación requerida (detección de ADN previamente amplificada por PCR).

6. Nanoestructuración de electrodos serigrafiados

6.1. Introducción

El tratamiento ácido de los NTC produce la aparición de defectos y grupos carboxilo en las paredes de los mismos, y sobre todo en sus extremos. Los NTC carboxilados resultantes son solubles en agua, en la que pueden formar suspensiones estables. Por el contrario, se ha observado que los iones presentes en solución salina contribuyen a apantallar las cargas superficiales de los NTC. En estas condiciones, los NTC tienden a agregarse, formando haces que sedimentan a lo largo del tiempo. Recientemente se ha demostrado que este fenómeno puede ser explotado para promover la formación de materiales compuestos. Por ejemplo, dado que la adición de sales a una suspensión acuosa de NTC induce la desestabilización transitoria de la misma, la incubación simultánea con PM resulta en la adsorción espontánea de los NTC sobre la superficie de las PM [146, 147, 149]. Los agregados de PM/NTC que se obtienen de esta forma pueden ser entonces confinados sobre un electrodo con la ayuda de un imán. Contrariamente a otras estrategias descritas para la producción de electrodos nanoestructurados, este método de modificación de superficies permite una rápida, sencilla y reversible producción de electrodos modificados con NTC. Además, como los NTC atrapados magnéticamente actúan como hilos conductores entre las PM y con la superficie del electrodo, este conexionado de los NTC permite no solamente nanoestructurar la superficie de los electrodos, sino también sensar electroquímicamente la superficie de las PM [147].

En este capítulo se presentan los distintos formatos de detección que se han ensayado en esta tesis, utilizando en todos los casos las superficies nanoestructuradas mediante atrapamiento magnético de NTC y realizando el sensado electroquímico en electrodos serigrafiados comerciales (SPE) (Figura 4.1 y Tabla 4.4). Todos los ensayos que se presentan en este capítulo aprovechan la nanoestructuración con NTC para la optimización de bioensayos mediante el sensado directo sobre las PM. De este modo, se captura y concentra un analito presente en la muestra mediante las PM, estas PM-analito se conexionan con los NTC, para después confinar magnéticamente el compuesto PM-analito/NTC sobre la superficie del sensor. Este método permite, por un lado, mejorar la captura del analito mediante la incubación de las PM con la muestra (analito) y, por otro lado, hacer un sensado en 3 dimensiones de la superficie de las PM de una manera muy eficiente usando un electrodo de 2

dimensiones gracias al conexionado de los NTC con las PM y con la superficie del electrodo.

Este capítulo se divide en 3 secciones dependiendo del método de captura del analito y la estrategia de detección que se utiliza. Como ejemplo de detección de moléculas electroactivas, en la Sección 6.2 se describe la detección de dopamina (DA). En este ensayo, la captura de la DA con las PM se debe a interacciones electrostáticas y la detección electroquímica se realiza mediante el análisis del pico de oxidación de la DA por CV. El ensayo propuesto en la Sección 6.3 detecta nanocristales de cadmio como marcador electroactivo no-enzimático, y se utiliza para sensar moléculas no electroactivas. En este caso, se ha llevado a cabo un inmunoensayo sobre las PM. Para ello, se ha usado un anticuerpo marcado con nanocristales de CdS y se ha detectado por CV el pico de oxidación del CdS sin necesidad de realizar su disolución. Finalmente, en la Sección 6.4 se estudia el sensado de marcadores y dianas enzimáticas usando como modelo la enzima mieloperoxidasa (MPO). De nuevo, el confinamiento de MPO sobre las PM se ha hecho por inmunocaptura. Sin embargo, en esta ocasión se ha llevado a cabo la detección de la actividad peroxidasa endógena de la MPO analizando por cronoamperometría la evolución de un sustrato enzimático (TMB). En estas 3 plataformas se mostrará como, mediante la utilización de los NTC en el sensado de la superficie de las PM, se consigue en la mayoría de los casos una mejora significativa en la sensibilidad de los ensayos.

6.2. Biosensado directo de moléculas electroactivas: detección de dopamina (DA)

6.2.1. Descripción y justificación del bioensayo

La DA es una catecolamina que actúa como neurotransmisora y mensajera química en el sistema nervioso y en muchas otras partes del cuerpo. En humanos esta molécula es importante para la función cognitiva y conductual de un individuo. Por ejemplo, la producción anormal de DA en el cerebro está asociada a varios trastornos neurodegenerativos y neurológicos como la esquizofrenia y el Parkinson [185]. Por otra parte, niveles elevados de DA en orina, sangre o saliva pueden indicar un mal funcionamiento hormonal, ingesta de drogas, o estrés y pueden confirmar el diagnóstico de tumores adrenales extraños como el feocromocitoma y el neuroblastoma [186, 187]. En vista de las consecuencias que pueden tener las variaciones de DA en el sistema nervioso central, es importante disponer de un sensor preciso y selectivo para su cuantificación.

Para la detección de DA solían utilizarse técnicas radioenzimáticas e inmunológicas, que han sido reemplazadas más recientemente por métodos cromatográficos más sensibles y selectivos. Los más habituales en la actualidad son la cromatografía líquida

de alta absorción (HPLC) y la electroforesis capilar, normalmente acoplados a detección por fluorescencia, por electroquímica, por ultravioleta o por espectroscopía de masas [188]. Estos métodos, sin embargo, necesitan de laboratorios y equipamiento caro y sofisticado, además de personal especializado para su utilización.

En la plataforma de sensado propuesta en esta tesis, la detección electroquímica de la DA consta de dos procesos: la captura y concentración de la DA presente en la muestra y su posterior detección electroquímica. Para el primer proceso, teniendo en cuenta que la dopamina está cargada positivamente a pH neutro ($pK_a = 8,87$), es habitual utilizar superficies cargadas negativamente para su atrapamiento electrostático [189, 190, 191, 192]. En este trabajo se utilizan micropartículas magnéticas cubiertas de estreptavidina (PM), que según la descripción del proveedor tienen un punto isoeléctrico ($pI = 5,0$), lo que significa que están cargadas negativamente a pH neutro. Por lo tanto, las moléculas de DA interaccionan con la superficie de las PM y quedan confinadas sobre las mismas por atracción electrostática (PM-DA). En estos experimentos las incubaciones se realizan en PBS con BSA 0.1 % y tween 0.02 %, para evitar la adsorción inespecífica (tanto de DA como de otras moléculas potencialmente presentes en la muestra).

La detección electroquímica de las PM-DA se realiza mediante el conexionado de NTC y el confinamiento magnético del compuesto PM-DA/NTC resultante sobre la superficie de electrodos serigrafados de distinto material y tamaño (Figura 4.1). La técnica voltamétrica que se utiliza para ello es la CV, realizando las medidas en una solución de 50 μL de tampón citrato (Tabla 4.2) utilizando un potenciostato comercial (Autolab PGSTAT 128N). El procedimiento completo ha sido resumido en la Figura 6.1.

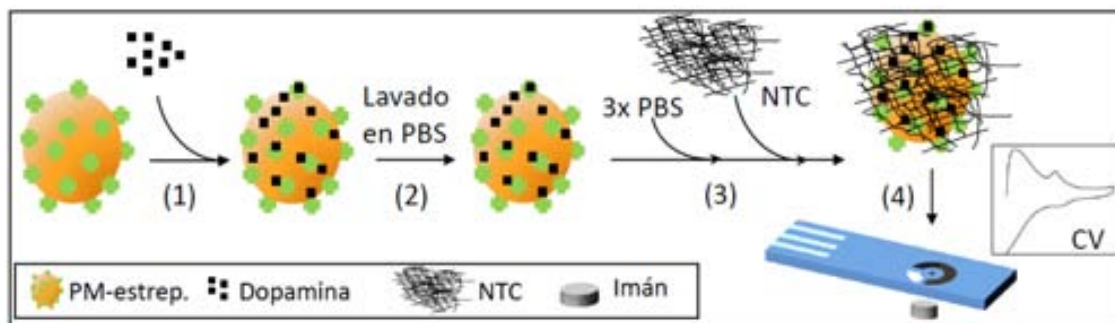


Figura 6.1.: Representación esquemática de la detección electroquímica de la DA. (1) Atrapamiento electrostático de la DA sobre la superficie de las PM. (2) Lavados de las PM-DA en PBS. (3) Conexionado de las PM con NTC mediante la adición de PBS (3 veces concentrado) y NTC. (4) Confinamiento magnético de PM/NTC en la superficie del C-SPE y medida electroquímica.

Una vez optimizado, el ensayo de detección electroquímica de la DA se realiza en 45 minutos, tiene un límite de detección de 2 nM DA en solución salina, no sufre interferencia en presencia de interferentes como el ácido ascórbico y el ácido úrico,

y es operacional en muestras reales de orina. Estos resultados han sido publicados recientemente en la revista *Sensors and Actuators B* ([193] y Subsubsección A.2.1.3).

6.2.2. Optimización de los parámetros de ensayo

Efecto del tamaño de PM en la captura de la DA

La detección de DA se realizó en paralelo en dos tipos de PM cubiertas de estrepta-vidina del mismo proveedor, M280 ($\phi = 2,8 \mu m$) y T1 ($\phi = 1 \mu m$), las cuales, como se ha comentado en la Sección 7.4.2, tienen superficies de características químicas similares, pero distinto tamaño.

Para la captura de la DA, se empezó por incubar las PM en rotación (10 *rpm*) durante 2 horas en 1 mL de 50 μM y 100 μM de DA siguiendo el protocolo descrito en [147]. Después de la incubación, las PM se lavaron 2 veces en rotación durante 5 minutos en 800 μL de PBST (Tabla 4.2) y una vez en 100 μL de PBS, esta vez sin rotar. Las medidas electroquímicas se realizaron tras el conexionado con los NTC y el atrapamiento magnético del compuesto de PM/NTC sobre la superficie de un sensor serigrafiado con electrodo de trabajo (WE) de Au (Au-SPE (b); $\phi = 1,6 mm$) (Tabla 4.4). Tras la modificación del WE con los PM/NTC, las CVs registradas mostraron una corriente de fondo más alta que las CVs que se obtenían en los sensores sin modificar. Esto presumiblemente refleja el aumento del área efectiva del WE, producido por la incorporación de los NTC, como ya se ha observado anteriormente [149]. Como se puede ver en la Figura 6.2, el conexionado con los NTC resulta en un codo a 0 V vs Ag, que ha sido previamente observado por otros autores [146, 147] y que se atribuye a defectos, y especialmente a los complejos oxigenados como los grupos carboxilo, presentes en los extremos de los NTC tratados con ácido.

La aparición de un pico de oxidación a +0,2 V vs Ag tras la incubación con DA, pero nunca en su ausencia (es decir, en las incubaciones con PBS solo), sugiere que la DA queda eficientemente retenida en la superficie de las PM. Si se analiza la eficiencia en el conexionado de los NTC con las PM de los 2 tamaños y la eficiencia en la captura de la DA de estas PM se constata que ambos son más eficientes en PM más pequeñas. Por ejemplo, y tal como se resume en la Tabla 6.1, los picos de DA registrados con las PM T1 son más reproducibles y un 40-60 % más altos que los picos medidos con las M280. Vemos también que la distancia entre picos (es decir, la diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción) es menor para las T1, lo que revela mejor reversibilidad de la reacción electroquímica.

Dado que los dos tipos de PM se utilizaron a concentraciones similares (5 $mg mL^{-1}$), y considerando las diferencias en tamaño, se utilizan 10 veces más PM en el caso de las T1 que para las M280, pero el área total de las mismas es del mismo orden de magnitud en ambos casos (3 5 – 5 $10^9 PM mL^{-1}$ y 11 – 15 $10^9 \mu m^2 mL^{-1}$ para las T1 y 3 – 3 5 $10^8 PM mL^{-1}$ y 7 4 – 8 6 $\mu m^2 mL^{-1}$ para las M280). Como se ha sugerido previamente, mientras las PM de mayor tamaño deberían dar cabida a

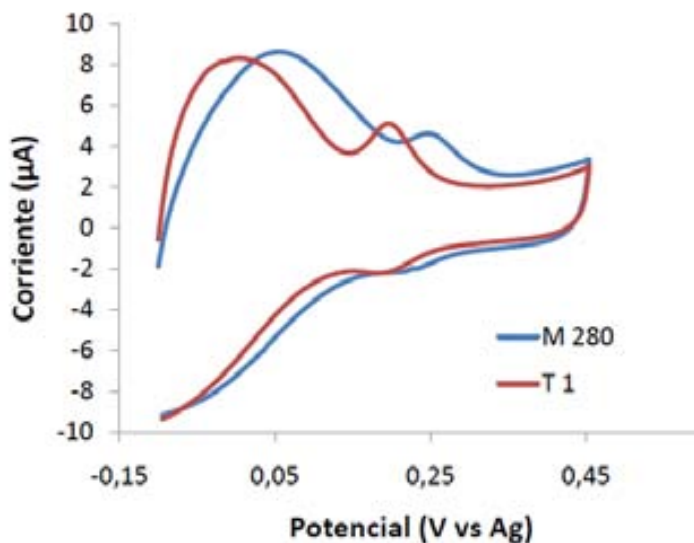


Figura 6.2.: CVs registradas en PBS tras la incubación de PM T1 y M280 con $100 \mu M$ de DA y atrapamiento magnético con NTC en un sensor de Au.

Concentración DA (μM)	T1	M280
50	$1,46 \mu A$	$0,66 \mu A$
100	$1,49 \mu A$	$0,84 \mu A$

Tabla 6.1.: Resumen de las alturas promedio ($n=3$) de los picos de oxidación registrados en las CVs tras la incubación de PM T1 y M280 con $100 \mu M$ y $50 \mu M$ de DA y detección electroquímica por conexión con NTC.

más NTC por partícula, las PM más pequeñas parecen producir empaquetamientos de NTC más densos [149]. Los resultados de este experimento apuntan también a una mejora significativa de la detección electroquímica de la DA por conexión con NTC cuando esta se lleva a cabo usando PM T1. Por lo tanto, para las siguientes medidas se utilizaron las T1.

Efecto del tamaño del electrodo en la eficiencia de conexión de los NTC

A continuación se estudió como afectaba el tamaño del electrodo de trabajo en la eficiencia de conexión de los NTC. Para ello, se incubaron las PM con DA $100 \mu M$ y, después de realizar los lavados especificados anteriormente, las PM-DA se detectaron por conexión con NTC en SPE con WE de Au de 2 tamaños: 1,6 mm (Au-SPE (b)) y 4 mm de diámetro (Au-SPE (a)) (Tabla 4.4). En la Figura 6.3 se muestran dos ejemplos de las CVs registradas en los dos tipos de electrodos. En general se comprobó que tanto la reproducibilidad entre medidas independientes como la altura de los picos de oxidación de la DA aumentaban cuando se utilizaban

electrodos más grandes. En concreto, mientras el coeficiente de variación (% CV) era menor al 15 % para todas las medidas realizadas en los electrodos de 4 mm, el % CV superaba 15 % para todas las medidas realizadas en los electrodos de 1,6 mm. Por lo tanto, para las siguientes medidas se utilizaron SPE con electrodos de trabajo de 4 mm de diámetro.

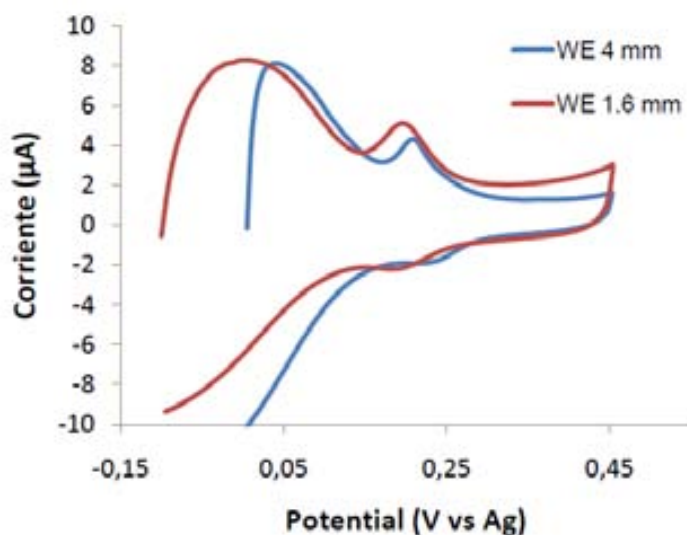


Figura 6.3.: CVs registradas en PBS tras la incubación de PMs T1 con DA $100 \mu M$ y atrapamiento magnético de NTC sobre Au-SPE ($\phi = 1.6 \text{ mm}$ y $\phi = 4 \text{ mm}$).

Optimización del tiempo de incubación de las PM con DA

Para determinar el tiempo de incubación necesario para la captura eficiente de la DA usando PM T1, se realizaron incubaciones en rotación (10 rpm) con 1 mL de DA $10 \mu M$, durante 15, 30 ó 60 minutos. A continuación se realizaron los lavados correspondientes y se confinaron magnéticamente las PM-DA junto con los NTC en electrodos de trabajo de 4 mm de diámetro para la detección electroquímica de la DA capturada. Los resultados mostraron que 15 minutos de incubación eran insuficientes, ya que los picos de oxidación de la DA aumentaban tras una incubación de 30 minutos (Tabla 6.2). Sin embargo, si se incubaban las PM con DA durante más de 30 minutos, en las CV no se obtenían picos más altos. Esto sugiere que, por lo menos a la concentración de DA estudiada, en incubaciones de más de 30 minutos (a) la superficie de las PM se satura y no se captura más DA, (b) la DA (capturada y/o en solución) se degrada y/o (c) la DA unida a las PM se desorbe de las mismas.

Estos resultados contrastan con los resultados previamente reportados para la inmunocaptura de la DA con partículas magnéticas de $2,8 \mu m$ de diámetro, que mejoraba con tiempos de incubación de hasta 2 horas [147], lo que puede indicar que la inmunocaptura de DA la protege en cierto modo de la oxidación espontánea. En nuestro

Tiempo de incubación (min)	Altura del pico (μA) (n=3)	% CV
15	0,98	18,42
30	1,31	7,9
40	1,17	19,96

Tabla 6.2.: Alturas del pico de oxidación de DA registradas tras la incubación de las PM T1 en $10 \mu M$ de DA durante 15, 30 ó 60 minutos.

caso, la atracción electrostática de la DA ocurre más rápido que la inmunocaptura, lo que conlleva una disminución del tiempo de incubación de 2 horas a 30 minutos, aunque también la reducción de la especificidad del ensayo.

Optimización del volumen de la muestra en las incubaciones

Para la optimización del volumen de la muestra, se incubaron las PM durante 30 minutos en distintos volúmenes de DA ($100 \mu L$, $500 \mu L$, $1 mL$, $1,5 mL$), a diferentes concentraciones ($0,1$, 1 , $10 \mu M$). Los picos de oxidación registrados fueron en todos los casos proporcionales a la concentración de DA presente en la muestra (Figura 6.4). Sin embargo, la incubación en volúmenes de muestra mayores resultó en un ligero descenso de la altura de pico medida, así como una mayor dispersión en los resultados. Este efecto se atribuye a que en volúmenes más grandes hay una dispersión mayor de las PM dentro de los eppendorfs en rotación. Se ha demostrado anteriormente que esto repercute negativamente en la recuperación de las PM tras las incubaciones y los lavados en rotación, afectando a la reproducibilidad del ensayo [194]. Como las incubaciones con volúmenes de $100 \mu L$ dieron los coeficientes de variación más bajos ($\% CV < 9$) para todas las concentraciones de DA ensayadas, las siguientes incubaciones se hicieron utilizando $100 \mu L$ de muestra.

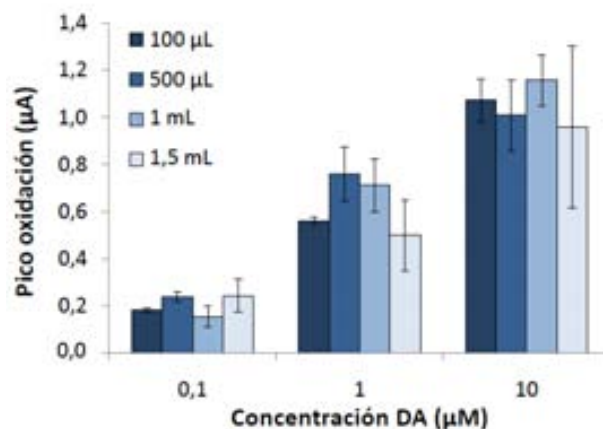


Figura 6.4.: Picos de oxidación registrados por conexionado de NTC y CV tras realizar la incubación de PM T1 con distintos volúmenes de DA.

Optimización de la cantidad de PM para la captura eficiente de DA

El último parámetro del ensayo que se optimizó fue la cantidad de PM necesaria para la detección eficiente de la DA. Para ello, la captura y concentración de la DA con PM se llevó a cabo en paralelo con distintas cantidades de PM en la muestra y la detección electroquímica se realizó después de mezclar las PM con cantidades proporcionales de NTC. No se analizaron volúmenes de PM mayores que $12 \mu\text{L}$ para no encarecer el ensayo, ni menores que $6 \mu\text{L}$ PM porque conllevaban una pérdida inaceptable de PM a lo largo de los lavados.

Como se puede observar en la Figura 6.5, cuanto mayor es la cantidad de PM en la muestra, mayor es la altura del pico de oxidación de DA registrado en la CV. Este efecto es más evidente para concentraciones más bajas de DA, para las cuales el aumento de PM en la muestra generaba unas tasas de recuperación mayores. Es lógico pensar que más cantidad de PM en la muestra conlleva más área superficial accesible para la captura de la DA. Además, es sabido que la incubación con cantidades mayores de PM se correlaciona con una mejora en la recuperación magnética de las PM a lo largo de los lavados y revierte en el aumento de la reproducibilidad del ensayo [194].

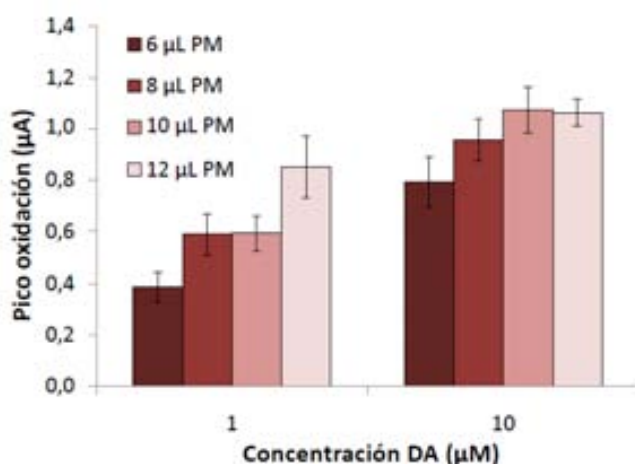


Figura 6.5.: Picos de oxidación registrados en CVs utilizando distintas cantidades de PM en la incubación con DA.

Elección del material del electrodo de trabajo

Finalmente, el ensayo de detección electroquímica de DA optimizado en los apartados anteriores se llevó a cabo en sensores del mismo tamaño y de la misma geometría, pero de diferentes materiales de electrodo de trabajo. Primero se compararon electrodos serigrafados con electrodos de trabajo de Pt, Au y carbono, que han sido descritos en la Sección 4.2. La Figura 6.6 muestra los picos de oxidación obtenidos en estos sensores para concentraciones crecientes de DA. En estas medidas, mientras

que los sensores de carbono generaban los picos de oxidación más altos para todas las concentraciones de DA analizadas, los picos de oxidación medidos en los sensores de Pt fueron los más bajos. Por otro lado, los sensores de Au no solo registraban picos de oxidación de la DA un poco más bajos que los sensores de carbono, sino que producían una mayor variabilidad entre medidas. Por ejemplo, mientras los coeficientes de variación (% CV) estaban por debajo del 11 % y el 17 % para los sensores de carbono y de Pt, respectivamente, el % CV del sensor de Au llegaba a ser del 27 % para algunas de las concentraciones ensayadas.

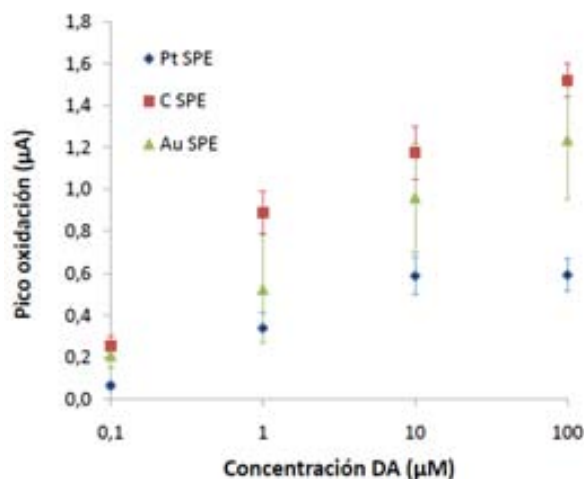


Figura 6.6.: Picos de oxidación registrados en las medidas de PM-DA/NTC en electrodos serigrafiados comerciales de distintos materiales pero con un WE del mismo tamaño (4 mm de diámetro).

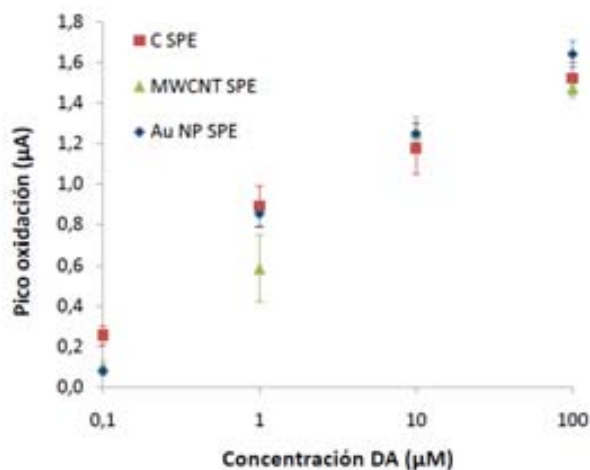


Figura 6.7.: Picos de oxidación registrados en las medidas de PM-DA/NTC en C-SPE sin modificar, o modificados por el proveedor con AuNP o MWCNT.

El que los sensores de carbono sean los que presentan el mejor conexionado con los NTC puede atribuirse a que los NTC disponen de orbitales perpendiculares a las superficies internas y externas de las paredes de los nanotubos [195]. Por ello, los NTC pueden interaccionar mediante apilamiento de orbitales (o interacción π - π) con otras moléculas, nanoestructuras y superficies que también presenten orbitales π . Este tipo de enlace se materializa mediante interacciones relativamente débiles, como las interacciones de Van der Waals. Por lo tanto, parece lógico que los NTC se adsorban mejor en superficies de carbono, que también contienen electrones deslocalizados en el orbital π . Al contrario, la interacción de los NTC con Pt y Au no es muy efectiva, ya que varios autores han demostrado la baja afinidad de las nanopartículas de Au y de Pt con los NTC monocapa [126].

Después de haber observado que el carbono es el material que más sensibilidad y reproducibilidad muestra para esta aplicación, se estudió si la utilización alternativa de electrodos de carbono nanoestructurados con nanopartículas de Au o con MWCNT producía una mejora en la detección de la DA mediante conexionado con NTC. Los sensores AuNP-C y MWCNT-C son sensores serigrafiados comerciales de DropSens. En este caso, los picos medidos en estos tres tipos de sensores fueron comparables y no se observaron diferencias significativas entre dispositivos (Figura 6.7). Sin embargo, el coeficiente de variación obtenido en las medidas en estos electrodos sí que era distinto, con $\% CV < 15$ para los MWCNT-C, $\% CV < 18$ en el caso de los AuNP-C y $\% CV < 11$ para los sensores de carbono. Como no se observó una mejora en la sensibilidad y variabilidad de los sensores modificados con AuNP o MWCNT respecto de los sensores de carbono sin modificar, se decidió continuar con los sensores de carbono por su buen funcionamiento y menor coste.

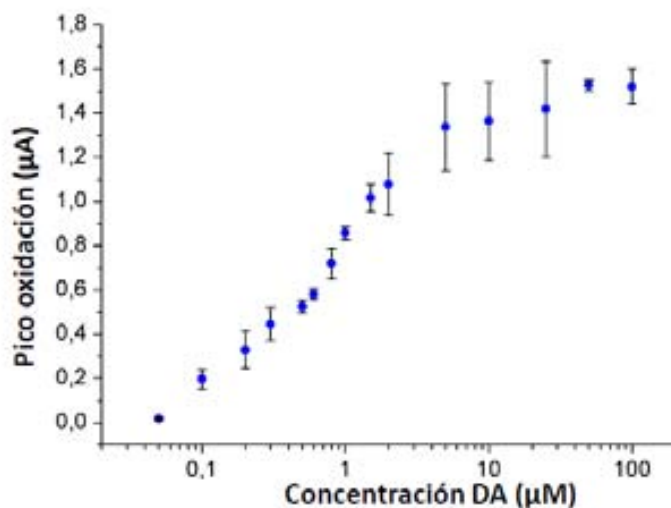


Figura 6.8.: Curva de calibración para la detección de DA usando C-SPE.

Por lo tanto, utilizando los parámetros anteriormente optimizados se realizaron me-

didadas de DA a concentraciones de $0,05 \mu M$ a $100 \mu M$ mediante conexasión con NTC y usando electrodos serigrafados de carbono. Como se ve en la curva de calibración de la Figura 6.8, el ensayo muestra una respuesta lineal en escala logarítmica para concentraciones de DA entre $0,1$ y $5 \mu M$, con saturación de señal para concentraciones de DA mayores que $50 \mu M$, y con un LOD, calculado como se describió en la Sección 4.6, de $2 nM$ en PBS BSA 0.1% tween 0.02% .

6.2.3. Detección de DA en presencia de interferentes

Detección de DA en presencia de ácido úrico (AU) y ácido ascórbico (AA)

En las muestras biológicas la DA coexiste con compuestos como el AU y el AA que interfieren en su detección electroquímica. Estos compuestos se encuentran en concentraciones mayores que la DA en las muestras reales, también son electroactivos y además se oxidan a potenciales similares al de la DA en la mayoría de los electrodos. Por este motivo, la mayoría de los sensores que han sido descritos para la detección electroquímica de la DA o bien son capaces de cuantificar el AU, el AA y la DA simultáneamente [189, 196, 197], o bien detectan preferiblemente la DA deshaciéndose del AA y del AU [147, 190, 198, 199]. En el primer caso, se intenta mejorar el comportamiento electrocatalítico de los electrodos para poder realizar la detección de los 3 compuestos simultáneamente. En el segundo caso, el electrodo se suele modificar para que esponga/exhiba una superficie cargada negativamente que promueva la atracción electrostática de la DA y la repulsión del AU y del AA [200, 201, 202, 203]. Como se ha comentado en la Subsección 6.2.1, mientras la DA tiene un $pK_a = 8,87$, el AU y el AA tienen $pK_a = 4,10$ y $pK_a = 5,40$, respectivamente. Por lo tanto, a pH neutro la DA estará cargada positivamente y el AU y el AA negativamente.

En nuestro trabajo, la detección de DA se basa en la atracción electrostática entre la superficie de las PM cargadas negativamente a pH neutro y la DA cargada positivamente. Se espera por tanto que, en estas condiciones experimentales, el AU y el AA sean repelidos de la superficie de las PM, evitándose cualquier interacción en las medidas electroquímicas. Para confirmar esta teoría, se detectaron concentraciones crecientes de DA ($0,1$ - $100 \mu M$ en PBS, BSA 0.1% , tween 0.02%) en presencia y en ausencia de $100 \mu M$ de AA y $100 \mu M$ de AU. Como medida de control, estas mismas soluciones de DA, AU y AA se detectaron directamente en el sensor, sin haber realizado la captura previa del analito con las PM. Para ello se utilizaron en paralelo C-SPE sin modificar (Solución en C-SPE) y C-SPE previamente nanoestructurados con PM/NTC siguiendo el protocolo optimizado en esta tesis (Solución en PM/NTC-C-SPE). Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 6.9.

Como se puede observar, cuando la DA se detectaba en solución usando un C-SPE, la presencia de interferentes producía un aumento en el pico de oxidación de la DA respecto al pico que se obtenía en ausencia de interferentes (Figura 6.9 y

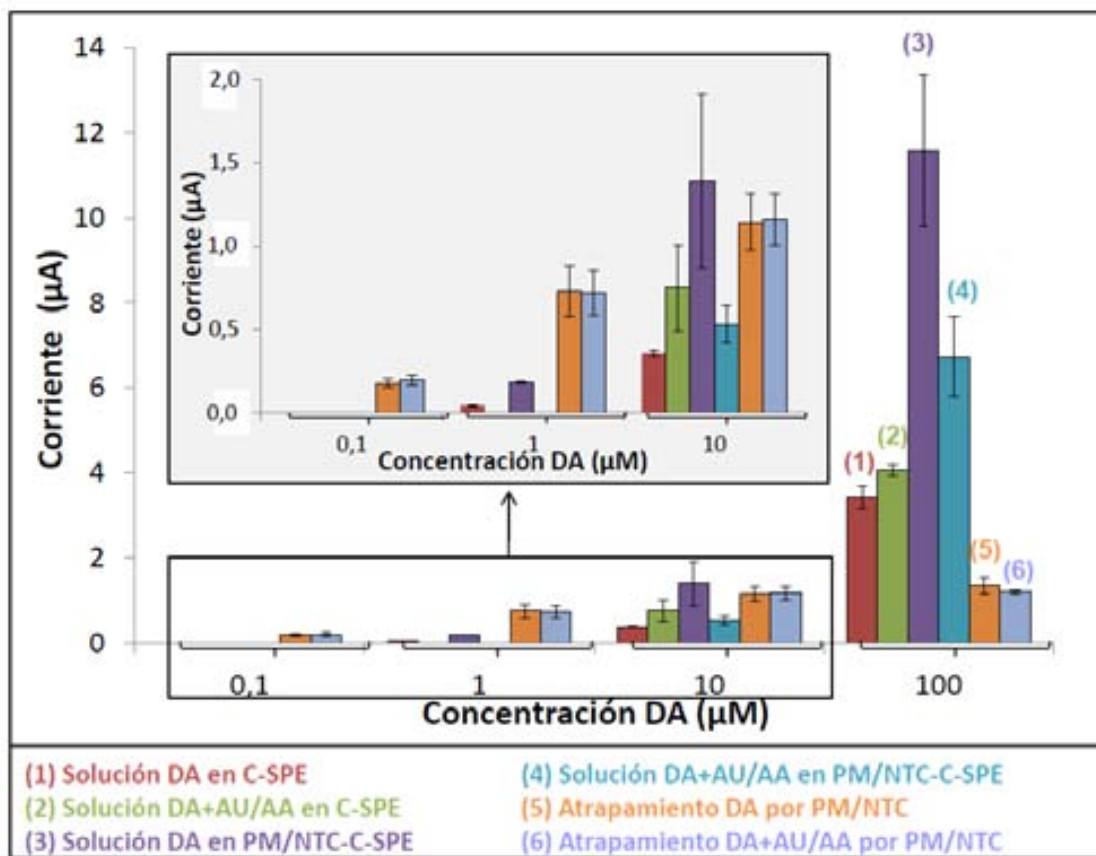


Figura 6.9.: Picos registrados en las CVs realizadas en soluciones de DA (0,1-100 μM) en presencia y en ausencia de 100 μM de AU y 100 μM de AA. La medidas se hicieron en paralelo usando C-SPE sin modificar (1 & 2), o C-SPE modificados por atrapamiento magnético con PM/NTC (3 & 4). Alternativamente, las mismas soluciones de DA con/sin AU y AA se incubaron con PM para llevar a cabo la captura y concentración de la DA. Tras el mezclado con NTC, los complejos de PM-DA/NTC se confinaron magnéticamente sobre C-SPE y se obtuvieron las CVs (5 & 6).

Figura 6.10). Esto se debía al solapamiento de los picos de oxidación del AA (0,17 vs Ag) y de la DA (0,10 vs Ag), que formaban un único pico en la CV.

Cuando se utilizaban los C-SPE previamente nanoestructurados con PM/NTC, la DA medida sin interferentes generaba picos 3-4 veces mayores que los que se medían en C-SPE que no habían sido modificados (Figura 6.9 y Figura 6.11). Este resultado concordaba con los resultados mostrados previamente [147], confirmando que la incorporación de NTC producía un aumento del área activa de los electrodos, mejoraba la actividad electrocatalítica hacia la DA y producía cierta preconcentración de la DA, presumiblemente debida a la atracción electrostática de los NTC carboxilados cargados negativamente. Sin embargo, el pico de oxidación del AA no se detectaba. Como el AU sí se detectaba, se dedujo que el pico del AA quedaba enmascarado por el codo que producen los NTC alrededor de 0 V vs Ag. En estos

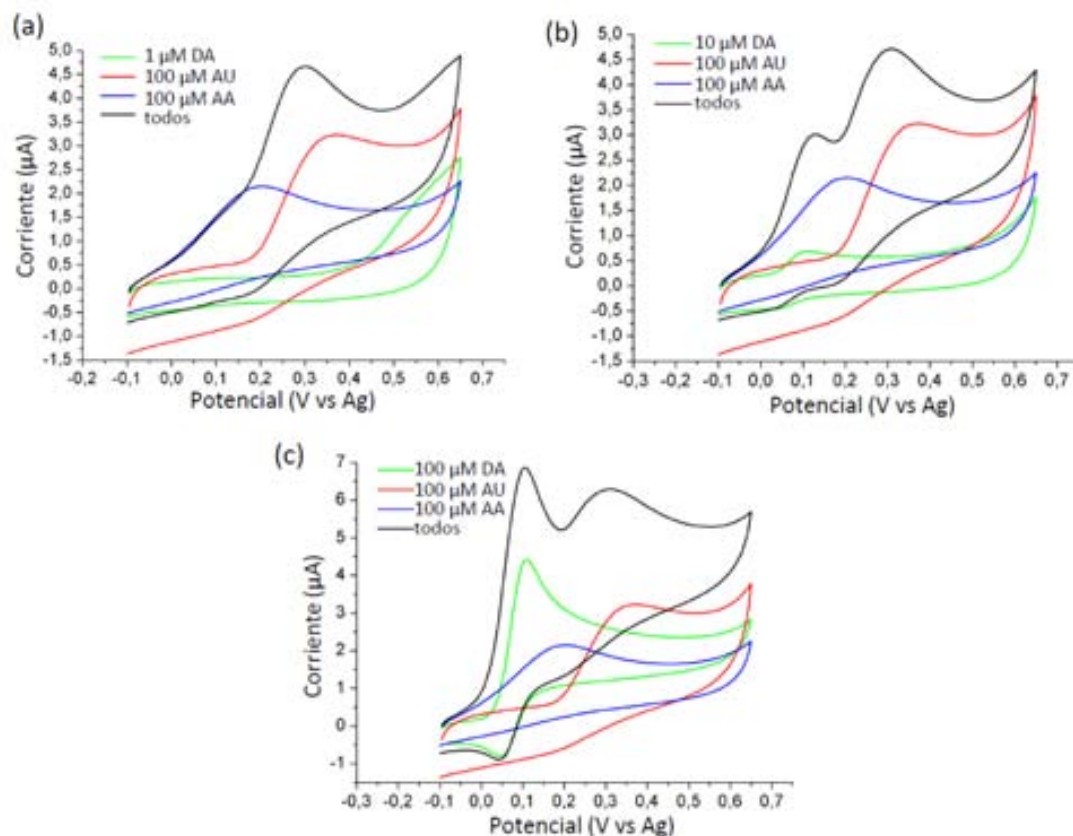


Figura 6.10.: Detección electroquímica de DA, AU y AA en solución. CVs realizadas en C-SPE en presencia de 100 μM de AU y 100 μM de AA con (a) 1 μM de DA, (b) 10 μM de DA y, (c) 100 μM de DA.

electrodos los picos de oxidación de la DA disminúan en presencia del AA y del AU respecto a los picos medidos sin interferentes. Como se observa en la Figura 6.9, 0,1 μM de DA no se detectaba en solución por ninguno de los electrodos y 1 μM de DA solo se detectaba en ausencia de interferentes en el sensor modificado con PM/NTC.

Por el contrario, cuando las PM se incubaban en una mezcla de DA, AU y AA, la DA se podía medir en todo el rango de concentraciones analizado, gracias a la captura y concentración de la DA que realizaban las PM. DA 100 μM era la única concentración para la que el pico de oxidación registrado era mayor cuando las medidas se hacían en solución. Esto concuerda con lo que se muestra en la Figura 6.8, donde se puede observar que la superficie de las PM está saturada para esas concentraciones. Además, los picos de oxidación de DA medidos en presencia y en ausencia de interferentes eran muy parecidos, lo que demuestra que el atrapamiento de la DA mediante las PM previene la interferencia del AU y del AA.

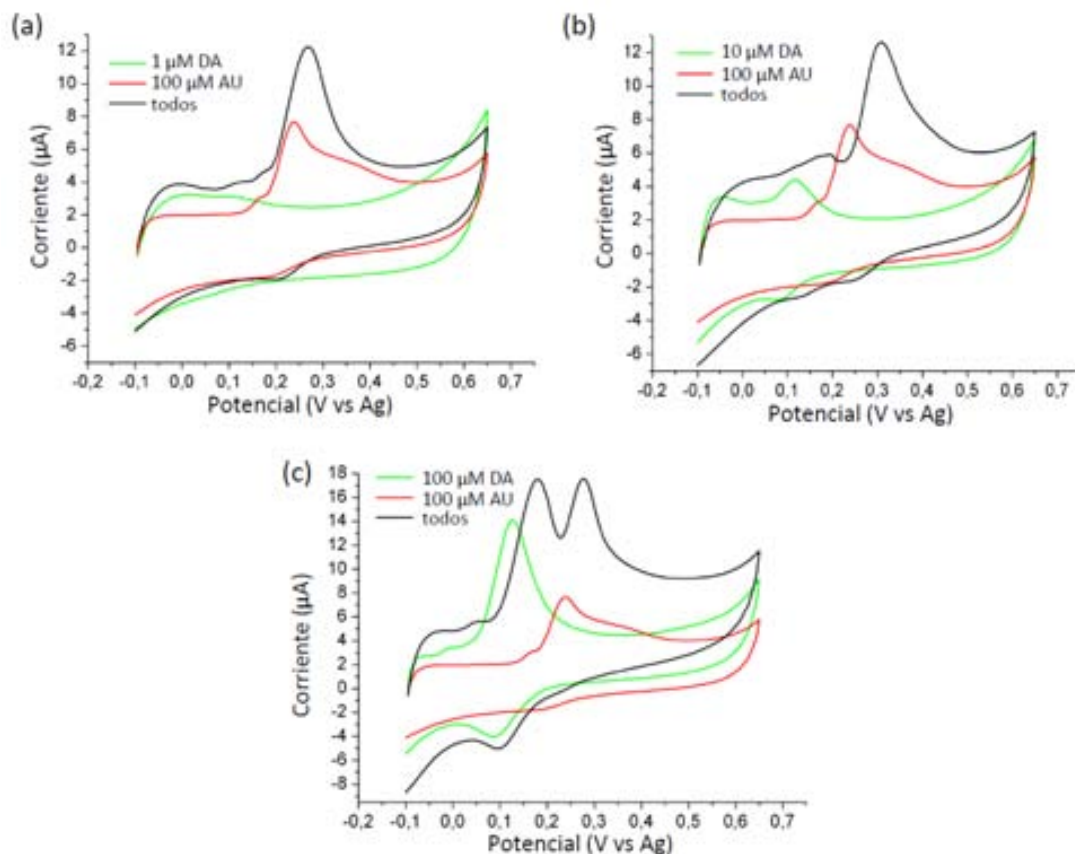


Figura 6.11.: CVs obtenidas usando C-SPE nanoestructurados por modificación con PM/NTC. Detección de AU ($100 \mu M$) y DA ($1-100 \mu M$) por separado o mezclados en solución: detección de DA (a) $1 \mu M$, (b) $10 \mu M$, y (c) $100 \mu M$.

Detección de DA en orina

El ensayo optimizado se aplicó finalmente a la detección de DA en muestras de orina. Se escogió este tipo de muestra ya que la obtención de orina resulta rápida, sencilla y no invasiva comparado con, por ejemplo, la adquisición de derivados sanguíneos (suero o plasma). Además, es sabido que la DA se encuentra en orina a concentraciones en el rango del alto nanomolar al bajo micromolar en individuos sanos [204, 205], mientras que en sangre o saliva la DA no se encuentra en concentraciones superiores al bajo nanomolar [206, 207, 208]. Por el contrario, hay que tener en cuenta que la composición y pH de la orina son muy variables y están determinados por factores como la dieta, el consumo de medicamentos o drogas, o el estado de salud [209, 210], los cuales pueden afectar negativamente la reproducibilidad del ensayo.

En este trabajo se empezó por estudiar el efecto de la complejidad de la matriz de muestra en la eficiencia del ensayo. Para ello, se inocularon las muestras de orina con concentraciones crecientes de DA de forma que, tras ser sometidas a distintos niveles de dilución con PBS, tween 0.02 %, todas las series presentaran las mismas

concentraciones de DA. Es decir, se ensayaron las mismas concentraciones de DA en muestras de complejidad creciente usando el protocolo optimizado anteriormente. Como se puede ver en la Figura 6.12, para cada concentración de DA analizada, la altura del pico de oxidación de DA disminuye a medida que aumenta la complejidad de la muestra. En la Figura 6.13 se pueden ver los porcentajes de recuperación de la DA añadida en distintas diluciones de orina. Para ello, se han normalizado los picos de oxidación obtenidos para cada concentración de DA en las distintas diluciones de orina respecto de los picos obtenidos para las mismas concentraciones de DA diluidas en PBS, BSA 0.1 %, tween 0.02 %.

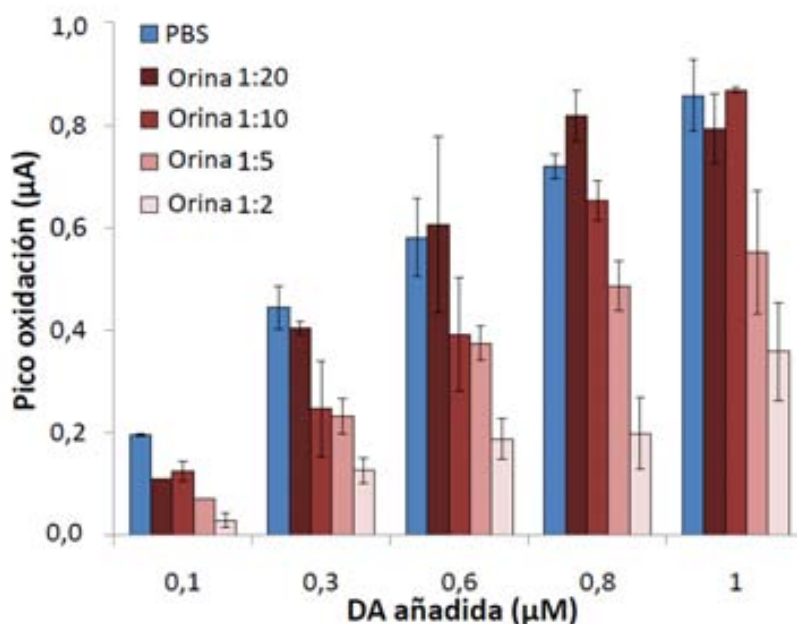


Figura 6.12.: Picos de oxidación de DA registrados en muestras de distintas diluciones de orina y en PBS. Las concentraciones finales de DA eran las mismas para todas las matrices de muestra.

Según los resultados obtenidos se pudo concluir que el LOD del ensayo empeoraba cuando aumentaba la complejidad de la muestra (Tabla 6.3). Así, los mejores resultados se obtuvieron para la orina diluida 1:20, para la que se consiguieron recuperaciones del 90-114 % para la mayoría de las concentraciones de DA ensayadas, y para orina diluida 1:10, para la que la recuperación de DA rondaba entre el 55 y el 100 %. En muestras menos diluidas los porcentajes de recuperación de DA disminuyen considerablemente, con recuperaciones promedio del 57 % y 31 % para la orina diluida 1:5 y 1:2, respectivamente.

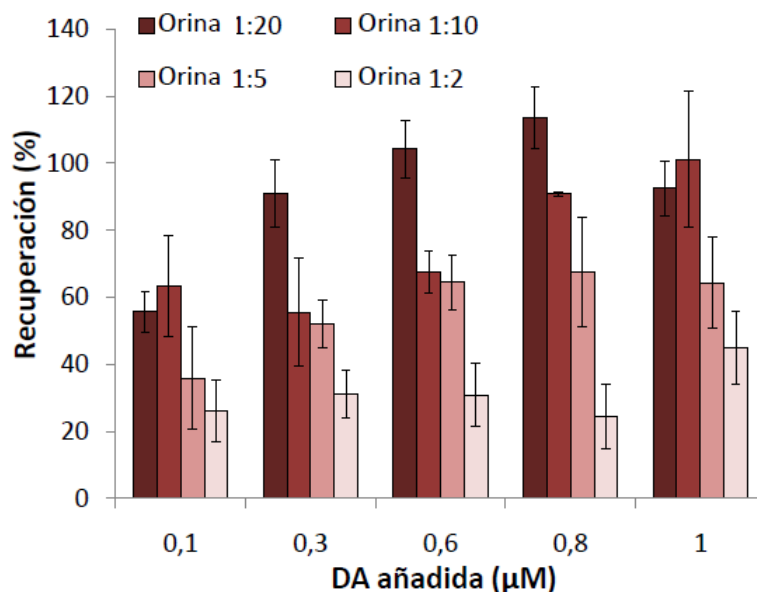


Figura 6.13.: Porcentajes de recuperación de la DA añadida a distintas diluciones de orina.

Orina		LOD		DA esperada en muestra diluida			DA medida	
Dilución	%	μA	nM	100 %	33 %	58 %	$I_{P_{ox}}(\mu A)$	% CV
1:20	5	0,005	11	37	12	21	0,004	7,09
1:10	10	0,079	57	74	24	43	0,008	15,49
1:5	20	0,069	72	148	49	86	0,023	74,77
1:2	50	0,080	130	370	122	215	0,036	30,33
No diluido	100	-		740	244	429	0,050	46,42

Tabla 6.3.: Resultados obtenidos para distintas diluciones de orina. La concentración esperada de DA se ha calculado a partir de la cuantificación realizada por HPLC en un laboratorio externo. Se muestran 3 valores, correspondientes a la concentración de DA que habría en la muestra si el 100 % estuviera libre en solución, o si este porcentaje estuviera entre el 33-58 % y el resto estuviera en forma conjugada.

Al contrario de lo que reportan la mayoría de los trabajos que se encuentran en la literatura, que en general detectan DA inoculada en muestras de orina a concentraciones significativamente superiores a las esperadas para DA endógena (Tabla 6.4), utilizando nuestro ensayo somos capaces de medir picos de oxidación atribuibles a la DA endógena presente en las muestras de orina (es decir, sin DA añadida; Figura 6.14). Como es de esperar, al llevar a cabo el ensayo en orina diluida a distintos niveles, se registraban picos más altos para muestras de orina más concentradas. Sin embargo,

la respuesta no era lineal en todo el rango de diluciones de orina (Figura 6.14, inserto). Esto sugería que las interferencias debidas a la composición de la orina eran proporcionalmente mayores para muestras de orina menos diluidas, lo que coincidía con lo observado por otros autores [211]. A pesar de esto, la altura de los picos registrados estaba por debajo del LOD del ensayo para todas las diluciones de orina, lo que impedía la cuantificación de DA por interpolación en las respectivas gráficas de calibración.

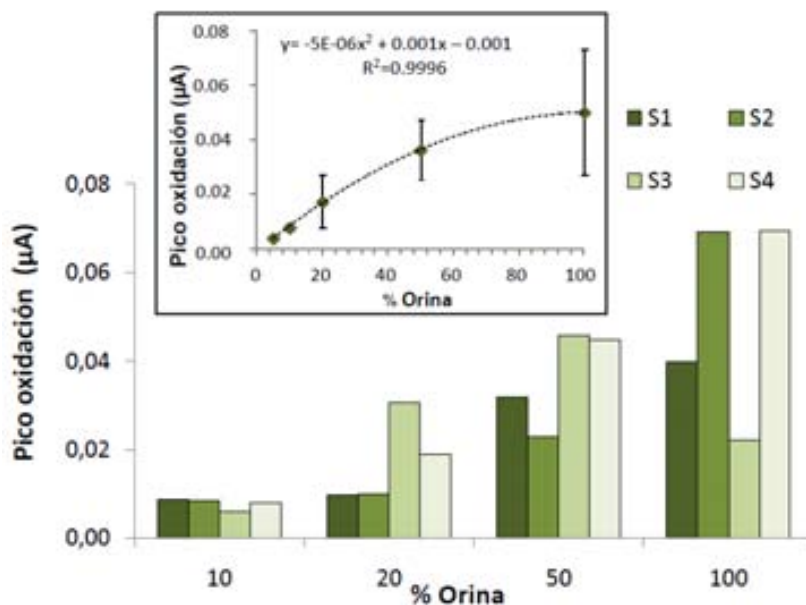


Figura 6.14.: Detección de DA endógena en 4 muestras diferentes de orina tras la dilución. (Inserto) Gráfica de picos medios registrados para las 4 muestras.

Las muestras de orina se analizaron paralelamente en un laboratorio de referencia (Osarten, K.E., Mondragón) mediante la técnica de HPLC para conocer la concentración real de DA. Estos análisis midieron una concentración de DA de $0,74 \mu M$ en las muestras prediluidas, por lo que se estimó que las muestras diluidas 1:20 a 1:2 deberían tener concentraciones de DA entre 37 y $370 nM$. Sin embargo, es sabido que al menos el 42-67% de la DA que se encuentra en la orina está sulfoconjugada, por lo que solamente un 33-58% de la DA presente está libre en solución. Por esta razón, la detección de la DA por métodos establecidos como la cromatografía o la electroforesis capilar, suele ser precedida de un pretratamiento de la muestra (por ej. microdiálisis, acidificación, purificación mediante intercambio de cationes, derivatización química, etc.) [188, 212]. En nuestro caso, para la detección electroquímica las muestras de orina se procesaron y analizaron directamente sin ningún pretratamiento adicional. Esto implicaba que, al tener menos del 33-58% de DA libre en la solución, tras la dilución correspondiente la concentración de DA en las muestras estuviera cerca o por debajo del valor teórico de LOD del ensayo. En vista de esto, se decidió realizar la cuantificación de la DA mediante el método de las adiciones

estandar en orina diluida 1:10 (Figura 6.15). El método de las adiciones estandar es una técnica muy conocida que permite superar la interferencia potencialmente producida por los componentes de una matriz de muestra especialmente compleja y que se fundamenta en la adición y detección de concentraciones crecientes de analito en un cierto volumen de muestra. Cuando se grafica la señal registrada (eje Y) respecto a la concentración de analito inoculada (eje X), la concentración endógena del analito se calcula como el intercepto de la aproximación lineal $Y=0$. Mediante este método calculamos que la concentración de DA era de $24,5 \text{ nM}$ para orina 1:10. Esto equivale a 245 nM de DA libre en orina sin diluir y podría corresponder a $0,44\text{-}0,77 \text{ }\mu\text{M}$ de DA total, lo que está de acuerdo con la concentración de DA medida en orina mediante el método de referencia ($0,74 \text{ }\mu\text{M}$).

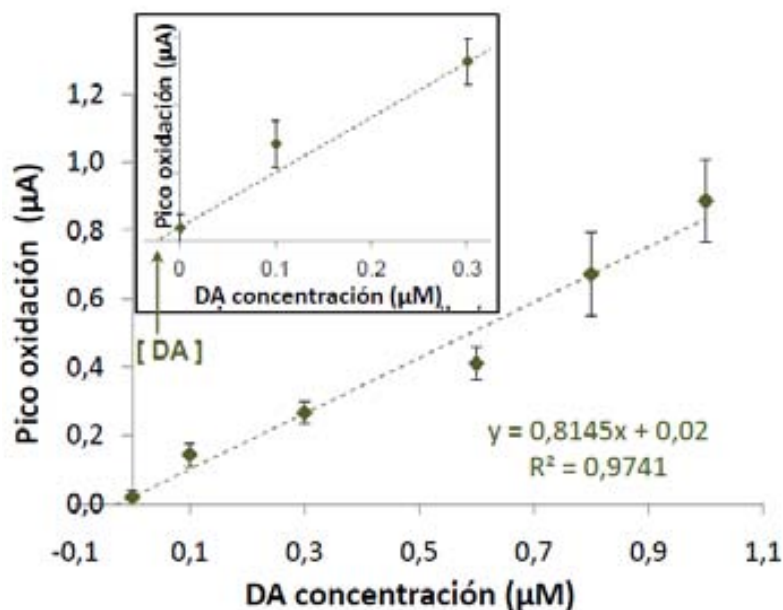


Figura 6.15.: Método de adiciones estandar aplicado en orina diluida 1:10.

6.2.4. Conclusiones

El método de detección de DA optimizado se realiza en 45 minutos y alcanza un LOD de 2 nM de DA en PBS. La captura de la DA se realiza de manera eficiente utilizando PM-estreptavidina comerciales y la detección electroquímica se realiza en unos sensores baratos y comerciales, C-SPE. El funcionamiento del método de detección se ha estudiado en muestras de orina. Estos resultados sugieren que el método descrito en este trabajo se puede utilizar para la monitorización de la DA en muestras reales de orina y que la implementación de un pretratamiento de muestra adecuado podría contribuir a mejorar significativamente su eficiencia de detección.

Electrodo	Rango lineal (<i>M</i>)	LOD (<i>M</i>)	Detección DA endógena	Concentración más baja de DA detectada / matriz	Ref.
Grafeno/Nanopartículas de Pd-Pt	4-200	0,04	No	10 <i>M</i> DA/orina diluida 1:100	[197]
GCE/Fe-natrolite zeolite & MWCNT	7,35-833	1,05	No	20 <i>M</i> DA/orina diluida 1:10	[213]
Grafeno sulfonado soluble en agua	0,2-20	0,02	NE	NE	[200]
GCE/PVP & grafeno	0,0005-1130	0,0002	No	200 <i>M</i> DA/orina no diluida	[214]
Electrodo Au/Au nanodendrite & SAM aniónico	0,1-5	0,02	No	0,3 <i>M</i> DA/orina no diluida	[215]
GCE/Grafeno funcionalizado con porphyrin	0,1-1	0,01	No	1 <i>M</i> DA/orina diluida 1:100	[203]
GCE/Silica mesoporoso & MWCNT	0,133-4,64	0,014	No	0,049 <i>M</i> DA/NE	[216]
GCE/Film p-TA & Au nanocluster	0,6-340	0,05	No	10 <i>M</i> DA/NE	[217]
Grafito pirolítico/naphthoquinone & MWCNT	0,01-0,07	0,003	No	50 <i>nM</i> DA/orina diluida 1:1000	
GCE/Grafeno, cyclodextrin & AuNP	0,5-4	0,15	No	10 <i>M</i> DA/orina no diluida	[218]
GCE/Compuesto polidopamina NanoAu	1-80	0,08	No	10 <i>M</i> DA/NE	[219]
Nanopartícula de SnO ₃ , MWCNT, Pasta de Carbono	0,3-50	0,03	No	NE/orina diluida 1:50	[220]
Electrodo Au/PEDOT & Film S – <i>CD</i>		0,18	No	1 <i>M</i> DA/orina diluida 1:50	[221]
Electrodo de grafito pretreatado	0,3-150	0,033	Sí (1,8 <i>M</i> DA)	4,97 <i>M</i> DA/orina diluida 1:2	[222]
Compuesto impreso de AuNPs@SiO ₂	0,048-50	0,02	Sí (0,3278 <i>M</i> DA)	0,2 <i>M</i> DA/orina diluida 1:5	[223]
GCE/Au NP, ADN & compuesto SFR	0,008-1,1	0,0002	Sí (0,01-0,02 <i>M</i> DA)	0,5 <i>M</i> DA/orina diluida 1:200	[224]
GCE/Hexacyanoferrate microstars & MWCNT	3-137	NE	No	3 <i>M</i> DA/orina diluida 1:50	[225]
Au-SPE (1.6 mm)/Conexionado PM (2.8 m)/SWCNT	0,78-50	0,120	No	10 <i>M</i> DA/orina diluida 1:10	[147]
C-SPE (4 mm)/Conexionado PM (1 m)/SWCNT	0,1-5	0,002	Sí (0,44-0,77 <i>M</i> DA)	0,1 <i>M</i> DA/orina diluida 1:10	Este trabajo

Tabla 6.4.: Sensores de detección electroquímica de DA en muestras de orina.

6.3. Biosensado de moléculas no electroactivas usando marcadores no enzimáticos: detección de cristales de CdS

6.3.1. Descripción y justificación del bioensayo

En esta sección se describirá la utilización de nanocristales semiconductores de cadmio (CdS) como marcador electroquímico no-enzimático, así como la implementación de la detección por conexionado con NTC para mejorar la sensibilidad del sistema. Para ello se ha llevado a cabo la detección electroquímica directa de los CdS, sin utilizar la disolución mediante ácidos para disolver los nanocristales previo a su detección electroquímica. Este trabajo se realizó durante una estancia en el grupo *Nanobiotechnology for Diagnostics* (liderado por la Dra. Pilar Marco) del *Institut de Química Avançada de Catalunya* (Nb4d-ICAQ, CSIC) y bajo la supervisión del Dr. Enrique Valera.

En la literatura existen mucho ejemplos en que las nanopartículas semiconductoras de CdS han sido utilizadas como marcadores no enzimáticos para la detección tanto de ensayos ópticos como electroquímicos [226]. Contrariamente a lo que ocurre cuando se usan marcadores enzimáticos, que requieren la adición de un sustrato adecuado, muchos autores han resaltado que la utilización de nanoestructuras permite la detección directa sin adición de reactivos. Sin olvidar que una nanopartícula puede producir señales más elevadas que las generadas por marcadores moleculares no enzimáticos (como fluoróforos o moléculas electroactivas). Es más, la utilización de nanopartículas semiconductoras de distintos materiales como CdS, PbS, ZnS, etc. permite la detección multiparamétrica [227], donde las nanoestructuras de diversas composiciones generan señales (emisión fluorescente, picos de oxidación o reducción, coloración) que les son características.

En comparación a los métodos ópticos, la detección electroquímica ofrece una serie de ventajas: es más económica, más rápida y más fácil de integrar en sistemas portátiles robustos, como se ha especificado en la Sección 3.1. Los métodos de detección electroquímica de nanopartículas semiconductoras más utilizados son las técnicas de redisolución “stripping” [38, 227], en que se detectan electroquímicamente los iones metálicos que forman las nanopartículas (por ej. Cd^{2+}). Para ello, es necesario disolver primero las nanoestructuras (lo cual suele hacerse por incubación en una solución de ácido nítrico, HNO_3), electrodepositar los iones resultantes sobre la superficie de un electrodo adecuado y, finalmente, detectar la oxidación de los iones metálicos durante su electrodisolución. No obstante, y a pesar de la contrastada eficiencia y sensibilidad de las técnicas de redisolución, la necesidad de disolver las nanopartículas semiconductoras usando ácido dificulta la integración de este tipo de estrategias de detección en plataformas portables como las descritas en la Sección 3.3. Por este motivo es remarcable el que algunos autores hayan descrito que es posible detectar electroquímicamente nanopartículas de cadmio sin necesidad de disolverlas con

ácido previamente si estas son suficientemente pequeñas en tamaño [228].

En este trabajo se han detectado nanocristales semiconductores de CdS sin utilizar ácidos en el proceso y se ha analizado como, al añadir NTC en el ensayo, aumenta la sensibilidad del sistema. Para ello, se ha diseñado un inmunoensayo usando CdS como marcador no-enzimático y se han determinado las condiciones óptimas de detección directa del mismo realizando la detección del CdS mediante distintas técnicas voltamétricas en C-SPE. Las partículas de CdS han sido producidas por el grupo Nb4d-ICAQ-CSIC (Barcelona) y se han conjugado con un anticuerpo anti-troponina (rabbit), también producido en el mismo grupo (Tabla 4.3). De este modo, se realiza la detección de un anticuerpo de conejo marcado con CdS (CdS-rabbit). Por otro lado, para la inmunocaptura y concentración de CdS-rabbit se han usado dos tipos de PM Dynabeads de Invitrogen de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro, con superficies modificadas con grupos tosilo (PM-tosilo; MyOneTM Tosylactivated) y con estreptavidina (PM-estreptavidina; MyOneTM Streptavidin T1). Ambos tipos de PM se han conjugado con un anticuerpo que reconoce específicamente anticuerpos de conejo (“antirabbit” o anticonejo; Tabla 4.3). El inmunoensayo consistió en la incubación en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente de las PM-antirabbit con concentraciones crecientes de CdS-rabbit, disueltas en PBS tween 0.05%. A continuación se realizaron 3 lavados en rotación con PBS tween 0.05%, de 2 min cada uno. La detección electroquímica se ha realizado directamente o tras el conexionado del complejo PM-antirabbit-rabbit-CdS con NTC sobre C-SPE (Figura 6.16). La técnica voltamétrica que se aplica es la voltametría cíclica en tampón acetato 0.2 M a pH 5.6 (Tabla 4.2) y en un potenciostato μSTAT 400 de Dropsens.

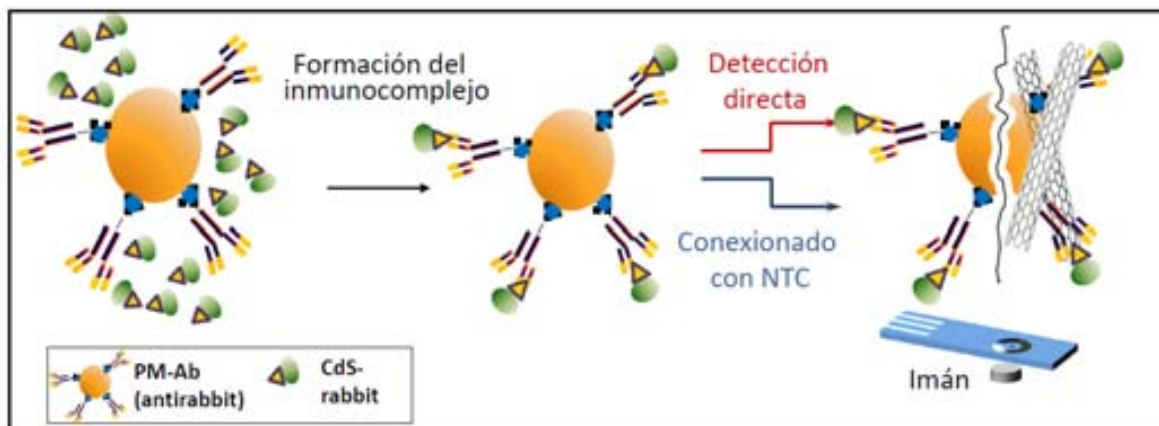


Figura 6.16.: Representación esquemática del inmunoensayo de detección de CdS-rabbit usando PM-antirabbit y llevando a cabo la detección electroquímica directa de los nanocristales de CdS (sin disolución ácida) en un C-SPE. Alternativamente se ha ensayado la detección del CdS por conexionado con NTC sobre el mismo tipo de C-SPE.

6.3.2. Optimización de los parámetros de ensayo usando PM con grupos tosilo

La detección electroquímica de los cristales de CdS se hizo primero utilizando las PM-tosilo de 1 μm de diámetro. Según la descripción del suministrador, estas PM muestran en superficie grupos p-tolueno-sulfonilo y son hidrofóbicas. Las PM se modificaron con un anticuerpo antirabbit siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor de las mismas, que consiste en la conjugación química de los grupos tosilo de las PM con los NH_2 del antirabbit (Subsubsección 4.3.2.2). Las condiciones para la producción de CdS-rabbit y su inmunocaptura usando PM tosilo habían sido previamente optimizadas por el grupo Nb4d-ICAQ-CSIC (Barcelona).

Así, en el inmunoensayo se incubaron 100 μL de distintas concentraciones de CdS-rabbit con 20 μg de PM-antirabbit durante 30 minutos en rotación. Debido a la interacción antígeno-anticuerpo (rabbit-antirabbit), se forma un inmunocomplejo PM-antirabbit-rabbit-CdS. Después, para reducir la adsorción inespecífica, se realizaban los lavados descritos anteriormente en PBS tween 0.05%. Finalmente, el inmunocomplejo se confinaba magnéticamente, directamente o tras el conexionado con NTC, sobre la superficie del WE de un C-SPE y se realizaba la detección electroquímica del CdS (Figura 6.16).

Optimización de la cantidad de NTC

Se empezó por estudiar como afectaba la cantidad de NTC empleada para el conexionado de las PM en la detección del CdS. Para ello, se realizaron inmunocapturas de una concentración fija de CdS-rabbit ($8,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) usando 20 μg de PM-antirabbit. Tras la inmunocaptura, los complejos PM-antirabbit-rabbit-CdS se lavaron varias veces con PBS tween 0.05% y se realizó el conexionado de las PM con cantidades crecientes de NTC siguiendo el protocolo descrito en la Subsección 4.3.3. Tras el confinamiento magnético de los complejos PM/NTC en la superficie del electrodo de trabajo, se realizó la detección electroquímica del CdS mediante CV en tampón acetato 0,2 M a pH 5,6. Los parámetros de la CV son los siguientes: primero se aplica un potencial de acondicionamiento a 0,6 V vs Ag durante 60 segundos, entonces se aplica un potencial de deposición a -1,2 V vs Ag durante 60 segundos, y finalmente se realiza el barrido entre -1,2 V y -0,3 V vs Ag a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} y un salto de potencial de 10 mV. La aplicación del potencial de deposición se utiliza para reducir todo el CdS presente en la muestra y así detectar su posterior oxidación.

Como se ve en la Figura 6.17, los cristales de CdS se detectaron por CV sin necesidad de realizar la disolución ácida de los mismos. Sin embargo, la detección mejora si se emplean NTC para el conexionado de las PM con la superficie del electrodo. Esto es, a medida que aumenta la cantidad de NTC (μL de una suspensión 1 mg mL^{-1}) aumenta también la altura tanto del pico de oxidación (-0,88 V vs Ag) como del

6.3 Biosensado de moléculas no electroactivas usando marcadores no enzimáticos: detección de cristales de CdS

de reducción (-1,02 V vs Ag) atribuidos al Cd. En paralelo se reduce la distancia entre los dos picos, hasta que se añaden 3 μL de NTC, para los que se observa una inversión de la tendencia. Esto sugiere que el conexionado con NTC aporta una mejora significativa a la detección del Cd. Como se ve en la Figura 6.18, si se añaden más de 3 μL de NTC, la detección no sigue mejorando. Esto se puede deber a que, para la cantidad de PM (20 μg) que utilizamos en el ensayo, 3 μg de NTC sean suficientes para cubrir y sensar bien la superficie de las PM. Si este fuera el caso, sería razonable que cualquier cantidad adicional de NTC usada no llegara a adsorberse eficientemente sobre la superficie de las PM; es más, estos NTC "suelos" (o no adsorbidos) podrían contribuir a una disminución de la reproducibilidad del ensayo. En la Figura 6.18 se ha resumido la altura promedio de los picos de oxidación medidos por CV y sus desviaciones. Como se observa, la utilización de NTC en la detección del CdS aumenta la altura del pico de oxidación de Cd hasta 7 veces.

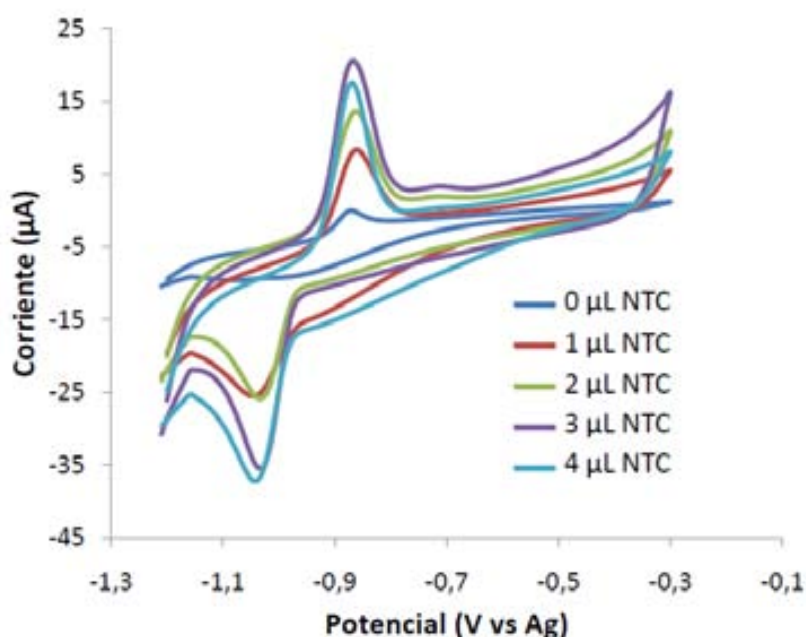


Figura 6.17.: CVs obtenidas en tampón acetato 0,2 M para compuestos PM-antirabbit-rabbit-CdS similares tras su conexionado con distintas cantidades de NTC.

Comparación con otros métodos de detección electroquímicos

La CV no es el método más comúnmente utilizado para la detección de CdS ya que, como se ha discutido anteriormente, las nanoestructuras metálicas suelen detectarse preferentemente por técnicas de redisolución [229]. Por ello, se comparó la detección mediante CV con la detección por voltametría de onda cuadrada (SWV). Los parámetros de la SWV aplicada son los siguientes: se aplica un potencial de acondicionamiento a 0,6 V vs Ag durante 60 segundos, luego se aplica un potencial

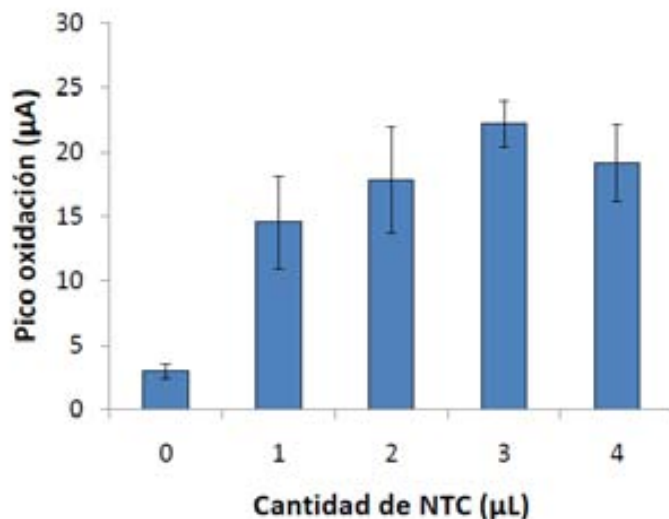


Figura 6.18.: Análisis de la reproducibilidad de las CVs realizadas con distintas cantidades de NTC.

de deposición a $-1,2$ V vs Ag durante 120 segundos, y el barrido se realiza entre $-1,2$ V y $-0,3$ V vs Ag a una frecuencia de 20 Hz, una amplitud de 50 mV y un salto de potencial de 10 mV.

Los resultados obtenidos indicaron que la detección por SWV y conexasión con los NTC no mejoraba la detección electroquímica del CdS respecto de la detección directa del CdS realizada sin NTC. Esto se atribuyó a que la incorporación de los NTC resultaba en un incremento significativo del ruido de fondo en los potenciales a los que se mide el Cd, enmascarando el pico de oxidación del mismo. Por lo tanto, se compararon solamente los resultados de la detección del CdS por CV con y sin NTC, y por SWV sin NTC (Figura 6.19). En paralelo también se realizó la detección del CdS tras disolución ácida. Para ello, después de que las PM-antirabbit capturaran el CdS-rabbit y se realizaran los lavados descritos anteriormente, se añadieron $110 \mu\text{L}$ de HNO_3 1 N y se agitó la solución durante 3 minutos para que se disolviera el Cd^{2+} . La medida electroquímica se hizo añadiendo los $100 \mu\text{L}$ de HNO_3 (con los iones de Cd disueltos) a $2,9 \text{ mL}$ de tampón acetato 0,2 M y $2 \mu\text{L}$ de bismuto (1 mg mL^{-1}). En este caso también se usaron C-SPE, pero dado el volumen final obtenido, las medidas se realizaron por inmersión del chip en la solución de medida.

En la Figura 6.19 se muestran los picos de Cd obtenidos con las distintas técnicas y tras la inmunocaptura de distintas concentraciones de CdS-rabbit. Como se observa en la gráfica, la detección directa del CdS por SWV, sin la utilización de NTC ni disolución ácida, es la técnica que genera los mayores picos de oxidación de Cd. El hecho de que la SWV directa genere picos de oxidación mayores que la SWV tras la disolución ácida de los nanocristales es inesperado y debe de estar ciertamente relacionado con el factor de dilución que implica la última. En el caso de las CVs, se

6.3 Biosensado de moléculas no electroactivas usando marcadores no enzimáticos: detección de cristales de CdS

ve como al añadir los NTC mejora la detección de CdS, obteniéndose picos significativamente más altos para todas las concentraciones de CdS-rabbit estudiadas que en la detección directa del Cd sin NTC y también una sensibilidad ligeramente superior a cuando se hace la detección por electrodisolución, que es la técnica más utilizada para la detección del CdS. Como se ha comentado anteriormente, la necesidad de utilizar ácidos para la disolución de los nanocristales de CdS tiene un gran inconveniente. Sin embargo, la detección por CV y conexasión con 3 μL de NTC no alcanza la sensibilidad de las medidas de detección directa (sin disolución ácida) realizadas por SWV.

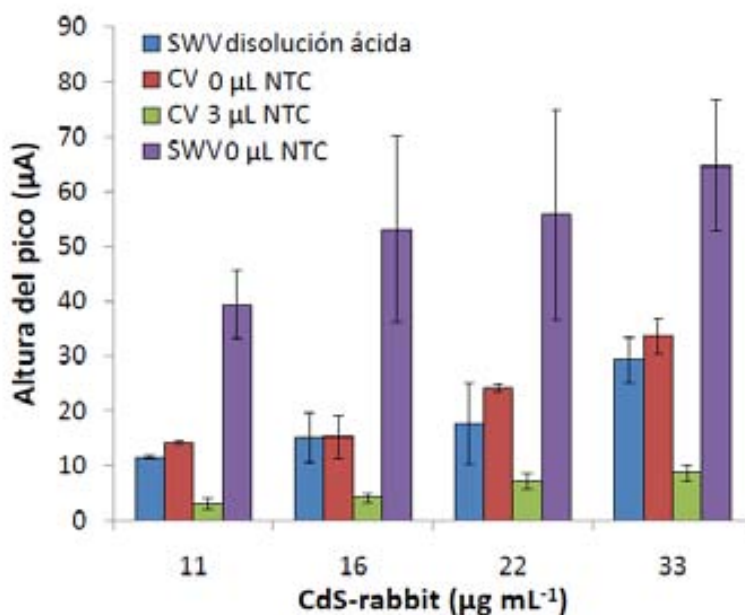


Figura 6.19.: Detección de concentraciones crecientes de CdS-rabbit mediante distintas técnicas.

El conexasión con NTC usando las PM-tosilo no ha generado los aumentos de señal esperados. El principal problema de las PM-tosilo es que generan mucha adsorción inespecífica del CdS-rabbit. Por lo tanto, dedujimos que el protocolo de la SWV debía de inducir la desorción del CdS adsorbido inespecíficamente, generando estas corrientes de Cd tan altas. Con el objetivo de reducir la adsorción inespecífica, decidimos cambiar de PM y probar el mismo ensayo con las PM-estreptavidina. Las PM-estreptavidina han sido utilizadas a lo largo de esta tesis para el conexasión con los NTC y, para estas, el protocolo de modificación y detección ha sido más extensamente optimizado. Es más, como ya analizó Olivé-Monllau et al. [149], aunque el conexasión de las PM con NTC se produce sobre PM con distintas propiedades superficiales, el conexasión más eficiente se consigue sobre las PM-estreptavidina.

6.3.3. Optimización de los parámetros de ensayo usando PM con estreptavidina

Las PM-estreptavidina tienen una superficie hidrofóbica y un diámetro de $1 \mu m$. Estas PM se han modificado mediante interacción biotina-estreptavidina con un anticuerpo biotinilado, anticonejo IgG (H+L) de Invitrogen (Tabla 4.3), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor de las PM (Subsubsección 4.3.2.2).

En este caso, el inmunoensayo ha consistido en la rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente de $75 \mu L$ de distintas concentraciones de CdS-rabbit y PM-antirabbit en PBS tween 0.05%. Los lavados llevados a cabo y la detección electroquímica son los mismos que se habían realizado anteriormente con las PM-tosilo (Figura 6.16).

Optimización de la cantidad de PM-antirabbit en el inmunoensayo

El inmunoensayo con las PM-tosilo había sido previamente optimizado por el grupo Nb4d-ICAQ-CSIC (Barcelona), pero al cambiar las PM hubo que reoptimizar de nuevo el inmunoensayo. En primer lugar, se optimizó la cantidad de PM-antirabbit que se utilizaba en la captura del CdS-rabbit. Para ello se realizaron las inmunocapturas incubando en paralelo 20, 30 y 40 μg de PM-antirabbit con $75 \mu L$ de $33 \mu g mL^{-1}$ de CdS-rabbit. A continuación se llevó a cabo la detección del CdS mediante CV con y sin conexionado de NTC ($3 \mu L$ de una suspensión $1 mg mL^{-1}$) con los mismos parámetros de medida que se habían utilizado en la detección del CdS con PM-tosilo. En este caso tampoco se compararon los resultados obtenidos por SWV con conexionado de NTC porque, como ya se había observado con las PM-tosilo, esta estrategia no aportaba ninguna mejora respecto de la detección directa por SWV (sin NTC) ya que el pico del Cd quedaba enmascarado por la corriente de fondo que se registraba en presencia de los NTC.

Como se ve en la Figura 6.20 y al contrario de lo que ocurría con las PM-tosilo, la SWV sin NTC no genera picos significativamente más altos que los obtenidos mediante las otras técnicas de medida. Es más, mediante CV por conexionado con NTC, se miden picos parecidos. De nuevo, la implementación del conexionado con NTC contribuye a aumentar la altura de los picos de oxidación del Cd obtenidas por CV para todas las cantidades de PM ensayadas. Si se analiza la cantidad de PM-antirabbit que se ha utilizado en la incubación, la utilización de 30 μg de PM-antirabbit para la inmunocaptura del CdS-rabbit y el posterior conexionado con los NTC es la que genera los picos de oxidación más altos de Cd.

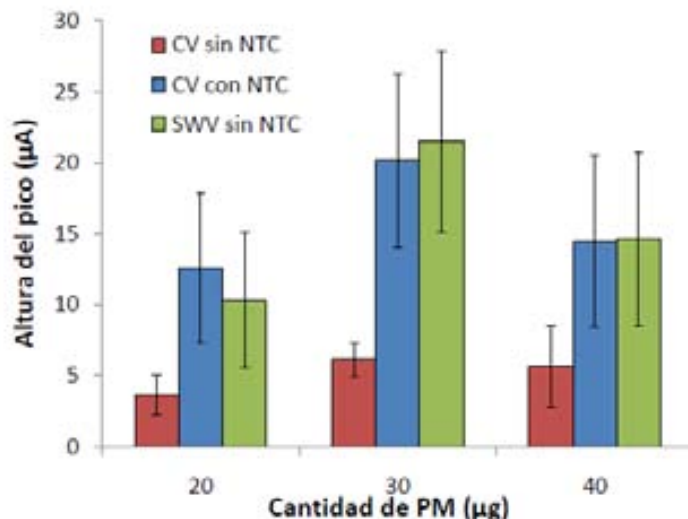


Figura 6.20.: Efecto de la cantidad de PM-antirabbit en la eficiencia de detección de CdS-rabbit mediante distintos métodos de medida electroquímica.

Optimización de la cantidad de NTC

Una vez optimizada la cantidad de PM-antirabbit que se iba a utilizar en la inmunocaptura, se optimizó la cantidad de NTC con la que se iba a hacer el conexionado de las PM-antirabbit-rabbit-CdS. En este caso, se realizaron las incubaciones en 75 μL de 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CdS-rabbit y con 30 μg de PM-antirabbit y se hizo la detección por CV con y sin conexionado usando concentraciones crecientes de NTC (0-4 μL de una suspensión de 1 mg mL^{-1}). Las mismas combinaciones de reactivos fueron detectadas en paralelo por SWV con y sin conexionado de NTC. Como se deduce de los resultados mostrados en la Figura 6.21, en las medidas de SWV, a medida que aumenta la cantidad NTC, la corriente de fondo aumenta y el pico de Cd se va enmascarando. Esto se traduce en una disminución de la altura de pico registrada proporcional a la cantidad de NTC usada para el conexionado de las PM. Los intentos posteriores de re-optimizar los parámetros de medida de la SWV no consiguieron mejorar en ningún caso los resultados obtenidos. Por el contrario, la Figura 6.21 muestra como en el caso de la CV, la adición de 1, 2 y 3 μL de NTC produce resultados similares en la altura del pico de oxidación del Cd. La utilización de cantidades mayores de NTC para el conexionado de las PM, por otra parte, resulta en la disminución del pico. Esto podría indicar que la formación de una red de NTC demasiado gruesa o densa termina interfiriendo en la transferencia de electrones entre la superficie de las PM y el electrodo, una posibilidad que no ha sido estudiada adicionalmente en el contexto de esta tesis. En consecuencia, se decidió utilizar 1 μL de NTC para conectar el inmunocompuesto (PM-antirabbit-rabbit-CdS) y así modificar la superficie del C-SPE lo menos posible facilitando su reutilización.

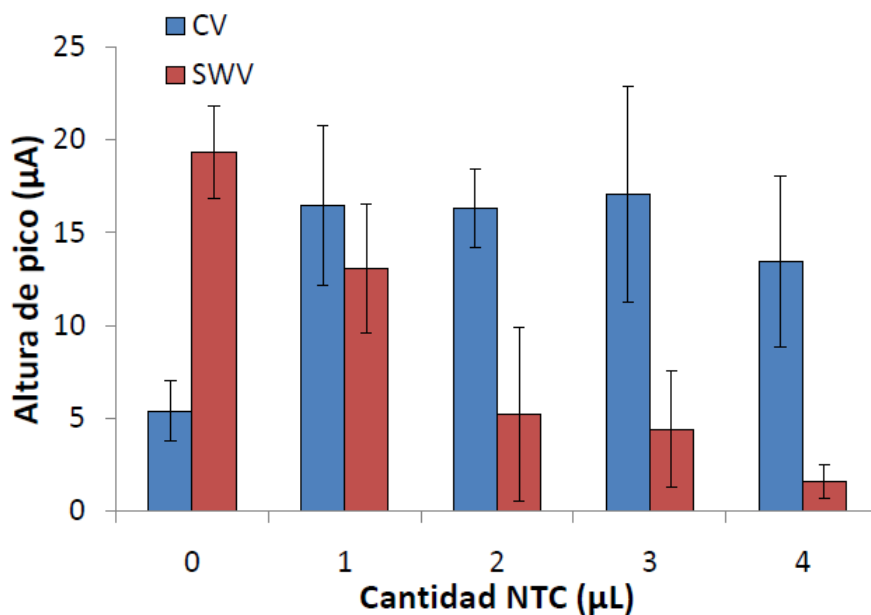


Figura 6.21.: Picos medidos por CV y SWV realizadas con o sin conexionado usando distintas cantidades de NTC. En todos los casos se realizaron inmunocapturas de una concentración fija de CdS-rabbit ($8,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) usando $30 \mu\text{g}$ de PM-antirabbit.

6.3.4. Obtención de una curva de calibrado para la detección de CdS-rabbit

Finalmente, usando el inmunoensayo optimizado para las PM-estreptavidina para detectar distintas cantidades de CdS-rabbit, se obtuvo una curva de calibración y se calculó el LOD del bioensayo con/sin el conexionado de los NTC. Estas medidas se hicieron incubando $75 \mu\text{L}$ de distintas concentraciones de CdS-rabbit preparadas en PBS tween 0.05 %, con $30 \mu\text{g}$ de PM-antirabbit durante 30 minutos en rotación. Tras los lavados correspondientes, se realizó el conexionado de las PM-antirabbit-rabbit-CdS con $1 \mu\text{L}$ de NTC (1 mg mL^{-1}) y se hizo la detección por CV en tampón acetato 0,2 M a pH 5,6.

En la Figura 6.22 se muestran las curvas de calibración obtenidas. El LOD del ensayo, calculado como se detalló en la Sección 4.6 a partir de la señal de los blancos más 3 veces su desviación estándar, resulta ser de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CdS-rabbit cuando se mide por CV y conexionado con $1 \mu\text{L}$ de NTC. Para las medidas realizadas por CV sin NTC el LOD sube hasta $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por lo tanto, al implementar el conexionado con NTC se consigue reducir el LOD del inmunoensayo alrededor de 30 veces.

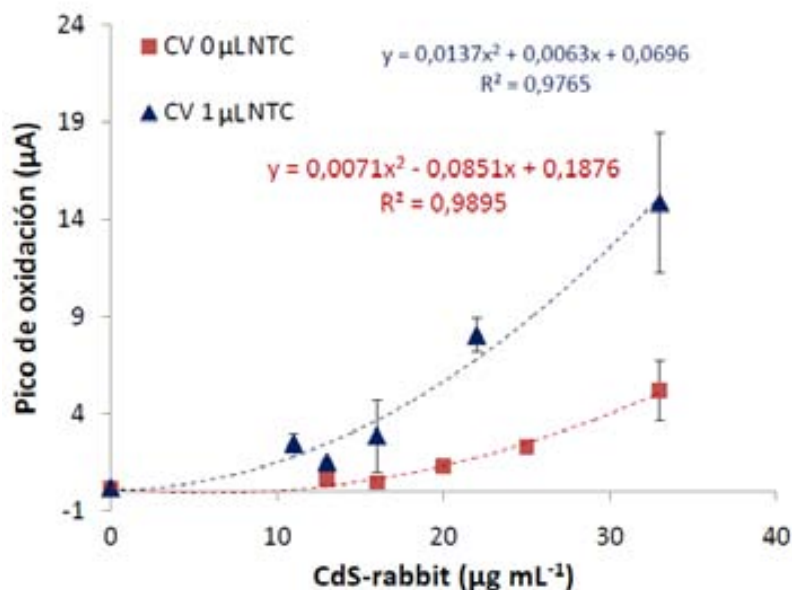


Figura 6.22.: Curva de calibración de detección de CdS de los picos de oxidación obtenidos de CVs realizadas con y sin NTC.

6.3.5. Conclusiones

Por una parte, se ha demostrado que se puede llevar a cabo la detección directa de los nanocristales de CdS mediante técnicas voltamétricas usando SPE, confirmando lo que ya había sido propuesto por otros autores.

La implementación del conexionado con NTC ciertamente contribuye a mejorar la detección del marcador por CV, llegándose a igualar con los resultados obtenidos por una técnica establecida como es la SWV tras disolución ácida de los cristales.

Sin embargo, la detección por CV y conexionado con NTC no produce resultados mejores que los de la detección directa por SWV (esto es, sin disolución ácida ni conexionado con NTC). Aunque la SWV es una técnica de medida más compleja que la CV, resultaría más fácil de realizar e integrar en un dispositivo tipo LOC que la detección por CV y conexionado con NTC.

Es importante destacar que en estos experimentos se ha podido comprobar que una de las mayores limitaciones para la detección directa de nanocristales semiconductores como marcadores no enzimáticos es que la incorporación de agentes bloqueantes (como BSA) durante la preparación de los inmunocombinados de CdS-rabbit o en el tampón de incubación contribuye a su bloqueo físico e interfiere en la posterior detección electroquímica. Sin embargo en ausencia de agentes bloqueantes el CdS-rabbit producía niveles inaceptables de adsorción inespecífica. Esto indica que la explotación de esta estrategia para la detección de analitos en matrices de mues-

tra real, mucho más complejas que el PBS tween empleado en estos experimentos, requerirá optimización adicional de las condiciones de ensayo y medida.

Se puede por tanto concluir que, aunque el conxionado con NTC puede mejorar la detección de moléculas no electroactivas usando nanocristales semiconductores como marcador no enzimático, no sería la estrategia óptima para este tipo de aplicaciones.

6.4. Biosensado de marcadores y dianas enzimáticas: amplificación de la señal en la detección de Mieloperoxidasa (MPO)

6.4.1. Descripción y justificación del bioensayo

El procedimiento de nanoestructuración de SPE con NTC para la optimización de bioensayos, mediante el sensado directo sobre las PM, se ha aplicado también a los inmunoensayos cuya detección electroquímica se realiza mediante reacción enzimática. En concreto en este apartado se describirá la aplicación del conexionado por NTC a la amplificación de señal para la detección electroquímica de la mieloperoxidasa (MPO). Los resultados obtenidos en el contexto de este trabajo han sido publicados recientemente en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* ([230] y Subsubsección A.2.1.4).

La MPO es una enzima peroxidasa de 150 kDa producida por neutrófilos y macrófagos, dos tipos de células sanguíneas. Esta se libera a los fluidos extracelulares y al sistema circulatorio central durante los procesos inflamatorios. Recientemente se ha comprobado que la monitorización de la MPO es un indicador sensible del infarto de miocardio [231, 232]. Por ejemplo, Baldus et al. [233] propusieron que los niveles altos de MPO en sangre podían servir para identificar a pacientes con un riesgo alto de presentar enfermedades cardiovasculares, independientemente de que presentaran o no necrosis de miocardio. También demostraron esta hipótesis Brennan et al. [231] y Meuwese et al. [234] que afirmaron que contrariamente a lo que ocurre con otros biomarcadores establecidos como la troponina T, la creatina kinasa y la proteína C reactiva, los niveles de MPO identifican a pacientes con riesgo de eventos cardiacos incluso en ausencia de necrosis de miocardio.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2008 murieron 17,3 millones de personas a causa de enfermedades cardiovasculares (ECV) y que, para el año 2030, más de 23 millones de personas morirán anualmente de ECV (Capítulo 1). Por lo tanto, si las ECV son y van a continuar siendo la principal causa de muerte en el mundo es necesario su diagnóstico fiable y rápido. Hoy en día, los tests y pruebas que se realizan habitualmente para detectar las ECV incluyen el electrocardiograma, la radiografía de tórax, el test de estrés, el test de plano inclinado, el ecocardiograma, la caracterización cardíaca, el test electrofisiológico, el TAC, la biopsia miocárdial, la resonancia magnética del corazón y la pericardiocentesis. Sin embargo, estos métodos están muy lejos de convertirse en sistemas de diagnóstico rápidos y portables (Sección 3.3). Con el objetivo de acercarnos a los sistemas de detección POC, en este trabajo se ha desarrollado un magneto inmunosensor para la detección electroquímica de la actividad enzimática de la MPO.

La detección sensible y específica de la MPO se hace, en la mayoría de los casos, mediante la captura por afinidad usando anticuerpos específicos contra la MPO

(antiMPO) en un formato de ensayo de tipo sandwich. De esta forma se usa un primer anticuerpo de captura inmovilizado sobre la superficie del sensor y, tras la inmunocaptura de MPO, se añade un segundo anticuerpo de detección que está conjugado a algún tipo de marcador (colorimétrico, fluorescente, enzimático, metálico, electroactivo, etc.). [194, 235, 236, 237, 238, 239, 240]. En este trabajo, la MPO se captura en la superficie de las PM previamente modificadas con antiMPO (Subsubsección 4.3.2.2). Luego, estas PM son atraídas magnéticamente mediante un imán a la superficie del electrodo, ya sea directamente o tras el conexionado con NTC (Figura 6.23). La detección electroquímica posterior se basa en la actividad peroxidasa endógena de la MPO, que es cuantificada usando un sustrato enzimático comercial listo para ser usado (TMB H_2O_2) (Subsubsección 3.1.1.4 y Subsección 4.1.5). En este contexto, la MPO cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y la oxidación del TMB. La detección electroquímica consiste entonces en la reducción del TMB oxidado en la superficie del electrodo [30]. Por lo tanto, cuanto mayor es la concentración de MPO en la solución, mayor es la altura del pico de reducción del TMB registrado.

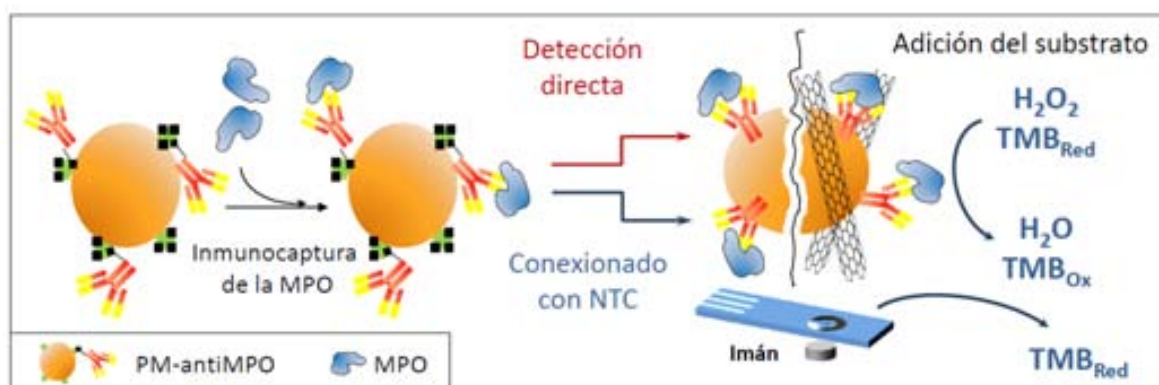


Figura 6.23.: Representación esquemática del inmunoensayo de detección de MPO con PM-antiMPO y detección electroquímica directa o tras el conexionado con NTC. Para la detección de la actividad peroxidasa endógena de la MPO se ha usado un sustrato comercial listo para usar que contiene H_2O_2 y TMB .

6.4.2. Detección espectrofotométrica de MPO

La optimización inicial del inmunoensayo se realizó mediante medidas de espectrofotometría. Estas medidas se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos utilizando un lector de ELISA Ascent Multiskan EX (Thermo Scientific), lo cual permite la detección simultánea de varias muestra y, por lo tanto, facilita la optimización del inmunoensayo.

En todos los casos, después de la modificación de las PM con antiMPO (descrita en la Subsubsección 4.3.2.2), se realizaba la incubación de las PM-antiMPO con soluciones de MPO a distintas concentraciones. Finalmente, se detectaba la actividad

6.4 Biosensado de marcadores y dianas enzimáticas: amplificación de la señal en la detección de Mieloperoxidasa (MPO)

enzimática de la MPO por adición de un sustrato enzimático comercial para medidas espectrofotométricas que contenía H_2O_2 y TMB (Subsección 4.1.5). La reacción enzimática se paraba entonces con ácido y se realizaba la medida de absorbancia a 450 nm (Figura 6.24).

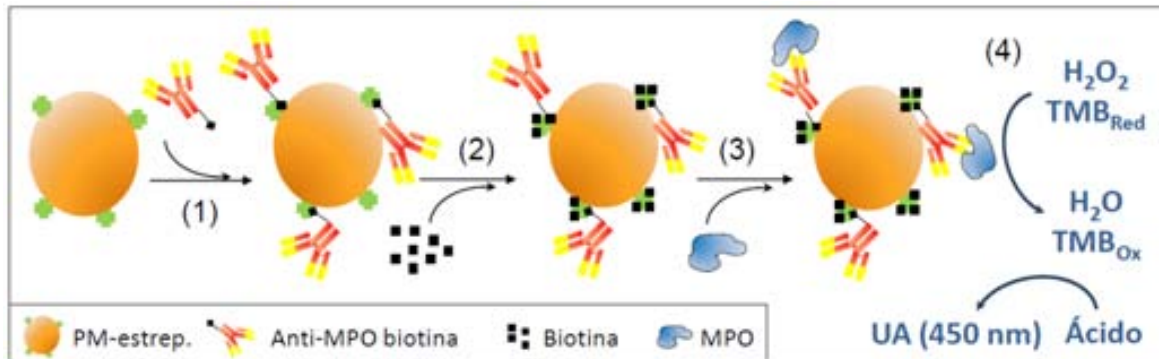


Figura 6.24.: Representación esquemática del proceso seguido para realizar la detección de la MPO por espectrofotometría. (1) Modificación de las PM con antiMPO; (2) bloqueo con biotina; (3) incubación con MPO; (4) adición del sustrato enzimático TMB y medición del TMB oxidado por absorbancia a 450 nm tras parar la reacción con ácido.

El primer parámetro del inmunoensayo que se optimizó fue la cantidad de PM-antiMPO que se utiliza para la captura de la MPO. Para ello, se incubaron en paralelo $6\ \mu L$, $8\ \mu L$ y $10\ \mu L$ de PM-antiMPO (5 mg mL^{-1}) con $100\ \mu L$ de MPO a distintas concentraciones (0 , $0,0625$, $0,125$, $0,25$, $0,5$ y $1\ \mu g\text{ mL}^{-1}$) preparadas en PBS, BSA 0.1% , tween 0.02% . Todas las inmunocapturas se realizaron en rotación durante 30 minutos, a temperatura ambiente y protegidas de la luz. A continuación se lavaron las PM 2 veces en $500\ \mu L$ de PBS tween 0.05% y una vez en $100\ \mu L$ de PBS tween 0.05% y se resuspendieron en $10\ \mu L$ de PBS. Esta reducción progresiva del volumen de lavado y resuspensión facilita el confinamiento de las PM y mejora la recuperación de las mismas. Tras los lavados, las PM se transfirieron a eppendorfs nuevos, se añadieron $100\ \mu L$ de TMB y se rotaron los eppendorfs a temperatura ambiente, protegidos de la luz, durante 20 minutos. Finalmente, la reacción se paró añadiendo $50\ \mu L$ de HCl 1 M , las PM se concentraron en el rack magnético y $100\ \mu L$ del sobrenadante se transfirieron a los pozos de la placa de microtitulación. Esto último se hacía ya que la presencia de PM en los pozos interfería ligeramente en la medida espectrofotométrica, produciendo señales de fondo más elevadas y, lo que era más importante, mayor variabilidad entre medidas. La medida espectrofotométrica se realizó mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de ELISA. En la Figura 6.25 se muestra que, en todos los casos, las señales registradas son proporcionales a la concentración de MPO y que $6\ \mu L$ de PM-antiMPO es la cantidad de PM que genera la mayor absorbancia. Como la MPO es una proteína dimerica se supuso que la utilización de más PM generaba agregación de las PM-antiMPO en la muestra, lo que podría afectar negativamente a la actividad enzimática de la MPO. Por otra parte, cantidades menores de PM

no fueron ensayadas porque generaban mayor variabilidad entre muestras. Esto era presumiblemente debido a la pérdida de un mayor porcentaje de PM a lo largo de las incubaciones y los lavados realizados en rotación, algo que ya ha sido sugerido por otros autores [194]. Por lo tanto, se utilizaron $6 \mu\text{L}$ de PM-antiMPO en los siguientes ensayos.

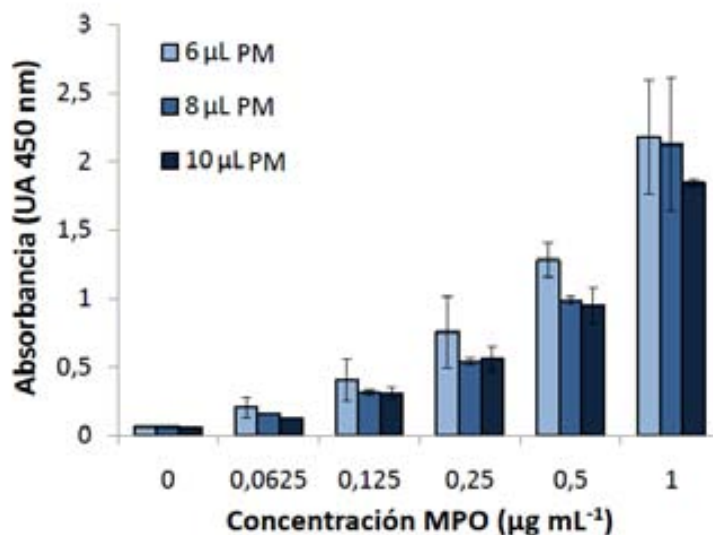


Figura 6.25.: Efecto de la cantidad de PM en la eficiencia de inmunocaptura y detección. Medidas espectrofotométricas con absorbancias medidas a 450 nm para distintas cantidades de PM-antiMPO en distintas concentraciones de MPO.

Después de optimizar la cantidad de PM que se va a utilizar en la inmunocaptura, se procedió a la optimización del tiempo de captura. Para ello, se incubaron $6 \mu\text{L}$ de PM-antiMPO con las concentraciones de MPO previamente analizadas durante 10, 15, 20, 30 y 40 minutos. Después de la incubación, se llevaron a cabo los lavados previamente descritos y se tomó la medida espectrofotométrica, leyendo la absorbancia a 450 nm . Como se ve en la Figura 6.26, 15 minutos de incubación son suficientes para capturar la MPO presente en la muestra. Las incubaciones más largas no producían una mejora en la captura de la MPO, e incluso resultaban en una ligera disminución de las señales registradas. Si por el contrario se disminuía el tiempo de incubación a 10 minutos la absorbancia registrada era menor. En este caso, también, se supuso que al aumentar el tiempo de inmunocaptura se producía agregación entre las PM-antiMPO que afectaba negativamente a la actividad enzimática.

De este modo el inmunoensayo optimizado consistía en 15 minutos de inmunocaptura con $6 \mu\text{L}$ de PM-antiMPO en $100 \mu\text{L}$ de muestra, lo que podría considerarse un inmunoensayo relativamente rápido, sencillo y barato.

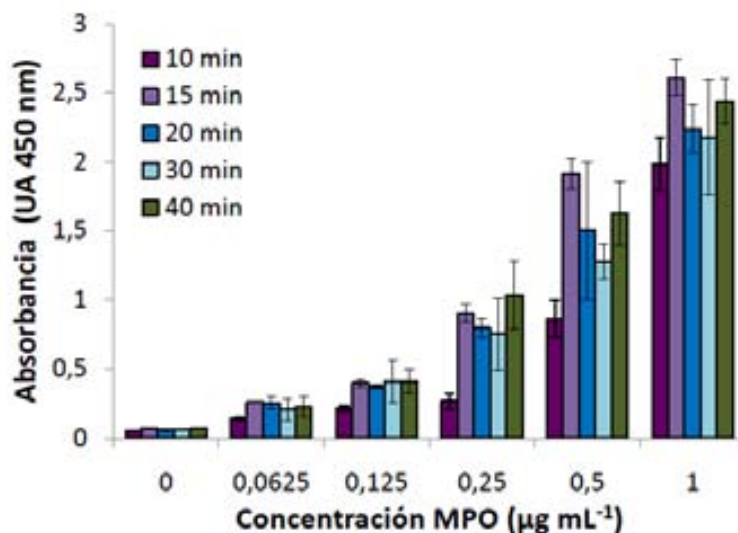


Figura 6.26.: Efecto del tiempo de incubación en la eficiencia de inmunocaptura con PM. Medidas espectrofotométricas de absorbancias medidas a 450 nm, para 6 μL de PM-antiMPO incubadas con concentraciones crecientes de MPO durante distintos tiempos de incubación.

6.4.3. Detección electroquímica de MPO

Una vez optimizado el inmunoensayo se pasó a optimizar la detección cronopotométrica de la actividad enzimática de la MPO. Como se ha mencionado en la Subsección 6.4.1, la MPO es una peroxidasa. La detección electroquímica de la peroxidasa se realiza normalmente utilizando sustratos enzimáticos que contienen H_2O_2 y un mediador redox como el TMB o la hidroquinona. En estas condiciones, la MPO cataliza la oxidación del mediador acoplada a la reducción del H_2O_2 y la corriente que se detecta en la superficie del electrodo se produce en la vuelta del mediador al estado reducido (es decir, se detecta una corriente de reducción).

En el mercado hay disponibles un gran número de soluciones estabilizadas de sustrato enzimático para peroxidasa "listos para usar" (Subsección 4.1.5). La mayoría de ellos contienen una mezcla de H_2O_2 y TMB (o, en su defecto, otro cromóforo que actúe como mediador de redox, como el ABTS o la *p*-fenilendiamina) a concentraciones no reveladas por el proveedor. Dado que tanto el H_2O_2 como el TMB son inestables en solución y sufren oxidación espontánea a lo largo del tiempo, estas soluciones comerciales a menudo contienen también otros componentes no necesariamente enunciados que garantizan la estabilidad de la misma. Sin embargo, la composición de estos sustratos comerciales ha sido optimizada para el análisis óptico/espectrofotométrico de la peroxidasa, por lo que algunos de sus componentes pueden presentar por sí mismos un comportamiento electroactivo que genere corrientes de fondo elevadas. Por este motivo, estas soluciones no suelen utilizarse para la detección electroquímica de las peroxidases, para la que se suelen preparar

diariamente mezclas de TMB y H_2O_2 de composición controlada. No obstante, la utilización de soluciones de sustrato enzimático diferentes a lo largo del tiempo afecta negativamente la reproducibilidad de un ensayo y resulta más difícil de integrar y transferir a una aplicación diagnóstica real que el empleo de una solución estable normalizada. A este efecto, en este trabajo se han ensayado sustratos comerciales "listos para usar" para la detección electroquímica de la actividad de la MPO (Sección 4.1). Como la composición de estos sustratos ha sido optimizada para el análisis espectrofotométrico, se ha empezado por estudiar el comportamiento electroquímico de dos preparados $TMB H_2O_2$ comerciales: "Enhanced K-Blue substrate" (TMB Mejorado) y "K-Blue Aqueous substrate" (TMB Acuoso) de Neogen Corporation.

Antes de las medidas cronoamperométricas, se realizó la inmunocaptura de la MPO con las PM y, tras los lavados correspondientes, las PM-MPO se confinaron magnéticamente sobre la superficie de un C-SPE (Figura 6.23). En un experimento "clásico" de detección electroquímica, a continuación se depositaría sobre el dispositivo una solución de TMB, se pondría en marcha la medida hasta que se obtuviera una corriente de fondo estable y entonces se añadiría el H_2O_2 para registrar el cambio en corriente producido por la enzima. En nuestro caso partíamos ya de una mezcla de $TMB H_2O_2$. Por ello, en la cronoamperometría se comenzó estabilizando la señal en PBS y entonces se realizó la medida en el sustrato enzimático apropiado. Esta primera estabilización de señal permitía detectar electrodos de comportamiento deficiente y normalizar las corrientes registradas en el sustrato enzimático para cada electrodo. De este modo, la señal registrada para cada concentración de MPO, I , se calculó substrayendo la corriente medida al añadir TMB ($t= 800$ s), de la corriente medida tras la estabilización de la señal en PBS ($t= 400$ s):

$$I = I(PBS)_{t=400s} - I(TMB)_{t=800s}$$

Utilizando estas condiciones y estos parámetros experimentales, la MPO se detectaba eficientemente en concentraciones de $0,0625$ a $1 \mu g mL^{-1}$. El sustrato enzimático TMB Mejorado generaba picos más altos para todas las concentraciones de MPO y para el blanco (Figura 6.27). Por lo tanto, el LOD del ensayo utilizando este sustrato enzimático era muy alto, $510 ng mL^{-1}$ de MPO. Inesperadamente si el sustrato enzimático TMB Mejorado se diluía 1:2.5 en PBS, las señales registradas en presencia de MPO aumentaban respecto a las señales registradas utilizando el sustrato enzimático sin diluir. Simultáneamente la corriente de fondo disminuía, lo que contribuía a disminuir el LOD del ensayo a $217 ng mL^{-1}$. Sin embargo, si este sustrato enzimático se diluía más las corrientes registradas disminuían y el ensayo no mostraba ninguna mejora adicional.

Aunque el sustrato TMB Acuoso generaba las corrientes más bajas para todas las concentraciones de MPO analizadas, también producía la corriente de fondo más baja. Por lo tanto, el LOD del ensayo usando este sustrato era el más bajo: 17,7

6.4 Biosensado de marcadores y dianas enzimáticas: amplificación de la señal en la detección de Mieloperoxidasa (MPO)

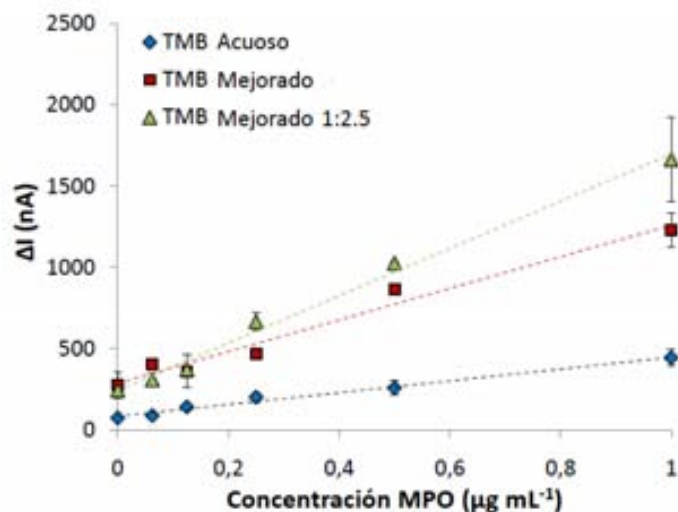


Figura 6.27.: Curvas de calibración distintos sustratos enzimáticos.

ng mL^{-1} de MPO. Es decir, cuando se utilizaba el TMB Acuoso se conseguía un LOD 28 y 12 veces más bajo que los valores obtenidos para el sustrato no diluido y diluido TMB Mejorado, respectivamente. Por lo tanto, se eligió para las siguientes medidas el sustrato enzimático TMB Acuoso. Sin embargo, el LOD obtenido en este ensayo era significativamente mayor que los LOD reportados por otros autores [194, 235, 236, 237, 239, 240] y no era lo suficientemente bajo como para detectar la MPO en muestras clínicas (Tabla 6.5).

Electrodo	Detección	Rango Lineal	LOD	Ref.
Sensor basado en sílice nanoporoso biogénico	EIS	1 pg mL^{-1} - 1 g mL^{-1}	1 pg mL^{-1}	[236]
Dispositivo basado en nanohilos de óxido de iridio	EIS	1 - 1000 ng mL^{-1}	$0,5 \text{ ng mL}^{-1}$	[237]
ITO modificado con un líquido iónico, AuNP, poly (0-phenylenediamine), NTC	CV	$0,2$ - $23,4 \text{ ng mL}^{-1}$	$0,05 \text{ ng mL}^{-1}$	[240]
Film compuesto de NanoAu/dióxido de cerio- <i>BMIMPF</i> ₆ /L-Cisteína	CV	10 - 400 ng mL^{-1}	$0,06 \text{ ng mL}^{-1}$	[238]
Film modificado con MWCNT/líquido iónico/dióxido de cerio	CV	5 - 300 ng mL^{-1}	$0,2 \text{ ng mL}^{-1}$	[239]
Electrodo de Pt microfabricado	Cronoamperometría	$0,9$ - 60 ng mL^{-1}	$0,4 \text{ ng mL}^{-1}$	[194]

Tabla 6.5.: Inmunosensores electroquímicos para detección de MPO previamente descritos en la bibliografía.

6.4.4. Amplificación de señal por conexionado con NTC

Con objeto de mejorar el LOD del inmunoensayo se estudió si se podían amplificar las señales de MPO obtenidas por cronoamperometría utilizando el conexionado de los complejos MPO-PM-antiMPO con NTC. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, el conexionado de los NTC se basa en el hecho de que los NTC se adsorben aleatoriamente sobre las PM y los complejos PM/NTC pueden ser entonces confinados fácilmente sobre la superficie del electrodo utilizando un imán [146, 147, 149, 241]. De esta manera, los NTC generan una red tridimensional que conecta las PM entre ellas y con la superficie del electrodo (Figura 4.5 a). En el caso de la MPO, analizamos como afectaba el conexionado de los NTC a la detección electroquímica de la actividad enzimática de la MPO.

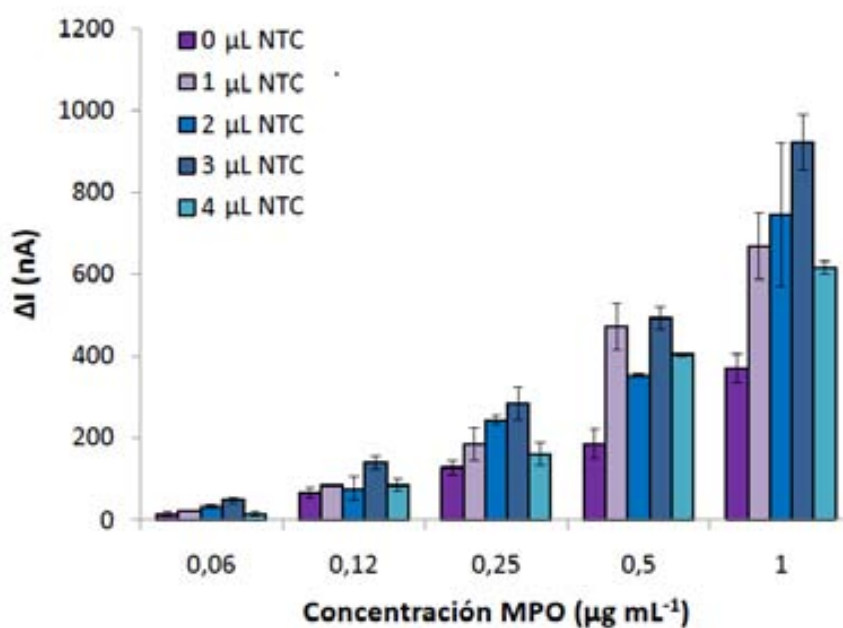


Figura 6.28.: Señales ΔI registradas para distintas concentraciones de MPO al aumentar la cantidad de NTC en el conexionado de los NTC con las PMs.

Para ello, inmediatamente después de la inmunocaptura de la MPO con las PM-antiMPO y los lavados correspondientes las PM se conexionaron con distintas cantidades de NTC (0-4 μL de una suspensión de 1 mg mL^{-1}). Después del atrapamiento magnético de los complejos PM/NTC en la superficie del electrodo de trabajo, se realizó la detección cronoamperométrica de la MPO como se describió anteriormente. Los picos I registrados se pueden ver en la Figura 6.28. Tanto la corriente de fondo como la variabilidad de las medidas eran un poco mayores para los dispositivos modificados con NTC, lo que indica un área efectiva mayor del electrodo. Para todas las concentraciones de MPO analizadas la corriente aumentaba al aumentar la cantidad de NTC hasta 3 μL NTC, para decaer de nuevo si se empleaban canti-

6.4 Biosensado de marcadores y dianas enzimáticas: amplificación de la señal en la detección de Mieloperoxidasa (MPO)

dades mayores de NTC. Además, la estabilización de la corriente de fondo era más lenta para concentraciones de NTC superiores a $3 \mu L$, lo que se atribuyó a una peor difusión del sustrato enzimático a través de capas de NTC más gruesas.

Si analizamos el comportamiento de los distintos sustratos enzimáticos en las medidas realizadas por conexión con NTC, de nuevo se obtenían señales mayores, pero también corrientes de fondo más altas, cuando se utilizaba el sustrato enzimático TMB Mejorado, independientemente de si se usaba sin diluir o diluido (Figura 6.29). En el caso del sustrato enzimático diluido, el LOD disminuyó de $217 ng mL^{-1}$ al detectar sin NTC, a $73 ng mL^{-1}$ de MPO cuando se medía mediante el conexionado con $3 \mu L$ NTC. Sin embargo, este valor seguía siendo demasiado alto para permitir la detección de MPO en condiciones fisiológicas. Al contrario, se obtuvo un LOD de $6 ng mL^{-1}$ de MPO cuando se utilizaba el TMB Acuoso, el cual era tres veces menor que el que se obtenía con este mismo sustrato midiendo sin NTC. La concentración fisiológica de MPO en sangre en individuos sanos es menor que $95 ng mL^{-1}$ y suele aumentar a $600 ng mL^{-1}$ en pacientes con enfermedades cardiovasculares [194]. Por lo tanto, se concluyó que la sensibilidad alcanzada por este ensayo posibilitaba la detección de MPO en muestras reales.

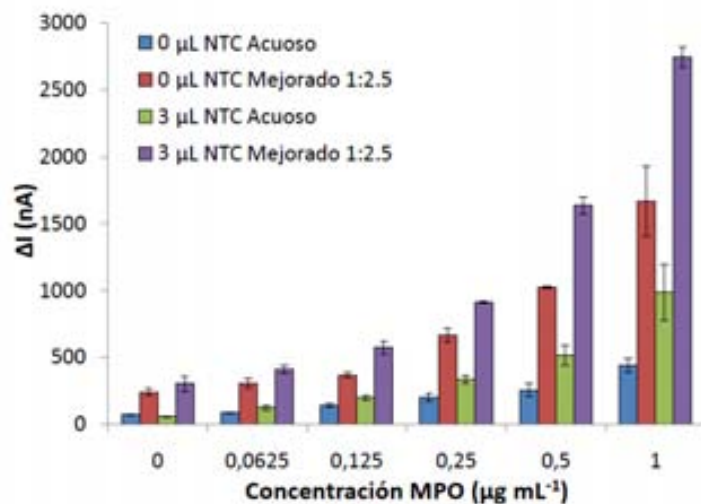


Figura 6.29.: Señales ΔI registradas para distintas concentraciones de MPO tras realizar la cronoamperometría con y sin conexionado de NTC y utilizando 2 sustratos enzimáticos distintos.

La Figura 6.30 muestra la curva de calibración obtenida con los parámetros de ensayo y detección optimizados anteriormente. El ensayo final incluía inmunocaptura con $6 \mu L$ de PM-antiMPO durante 15 minutos y detección cronoamperométrica por conexión con $3 \mu L$ NTC utilizando el sustrato enzimático TMB Acuoso. Así, la curva de calibración tiene una tendencia lineal entre $0-0,12 \mu g mL^{-1}$ de MPO y una tendencia polinómica en todo el rango de concentraciones analizadas ($0-4 \mu g mL^{-1}$), donde la señal se satura para concentraciones superiores a $4 \mu g mL^{-1}$ de MPO. La

Figura 6.31 muestra algunos ejemplos de los cronoamperogramas obtenidos en el TMB Acuoso con los parámetros del ensayo y detección optimizados.

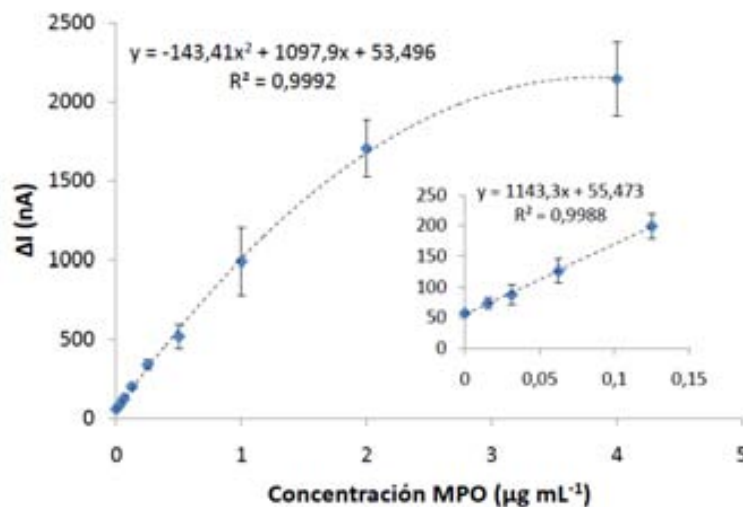


Figura 6.30.: Curva de calibración de las señales producidas por concentraciones crecientes de MPO utilizando 3 μL de NTC, el substrato enzimático TMB Acuoso y sensores C-SPE (Inserto) Calibración lineal entre 0-0,12 $\mu g mL^{-1}$ de MPO.

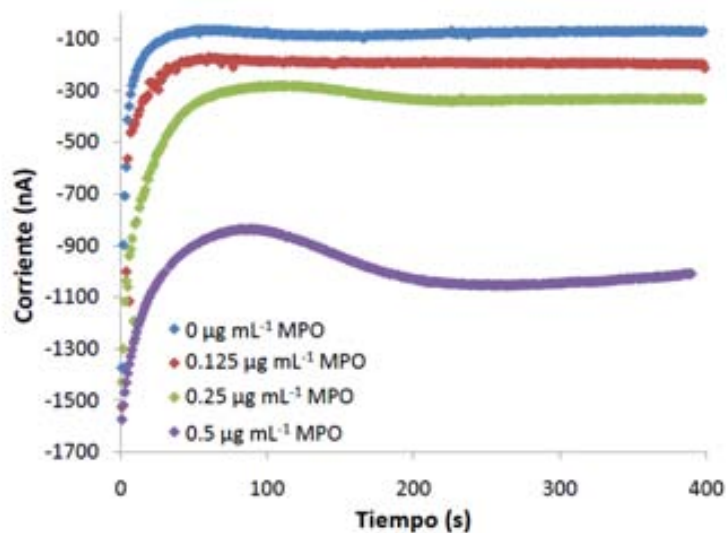


Figura 6.31.: Medidas cronoamperométricas realizadas mediante conexión con 3 μL de NTC, el substrato enzimático TMB Acuoso y sensores C-SPE.

6.4.5. Aplicación a la detección de MPO en suero sanguíneo

Finalmente, se analizó la aplicabilidad del método de detección propuesto al estudio de muestras reales. Con esta finalidad se obtuvo suero sanguíneo humano de origen comercial, proveniente de individuos sanos (Subsección 4.1.4). Este suero fue entonces diluido 1:100, 1:50 y 1:10 con PBS tween 0.02 % y a estas diluciones se les añadieron concentraciones finales similares de MPO. La Figura 6.32 muestra las curvas de calibración obtenidas para concentraciones crecientes de MPO preparadas alternativamente en PBS BSA 0.1 % y en distintas diluciones de suero humano. Se esperaba que la recuperación de la MPO y el comportamiento del ensayo empeoraran con la complejidad de la muestra, efecto que se ha observado y atribuido previamente a la difusión y cinética de inmunocaptura más lenta de los analitos en muestras más complejas y viscosas [194]. En nuestro caso, para todas las muestras analizadas los valores de recuperación de la MPO estaban entre el 84 y 114 %, con recuperaciones medias de 110, 99 y 97 % en suero diluido 1:100, 1:50 y 1:10, respectivamente. Es más, la complejidad de las muestras en el suero menos diluido parecía contribuir a mantener baja la variabilidad de los blancos sin explicación aparente y esto contribuía a obtener un LOD de $5,43 \text{ ng mL}^{-1}$. Del mismo modo, la corta duración del tiempo de incubación y la serie de lavados realizados en rotación limitaban la unión o adsorción no específica a la superficie de las PM, previniendo interferencias en el posterior conexionado con los NTC.

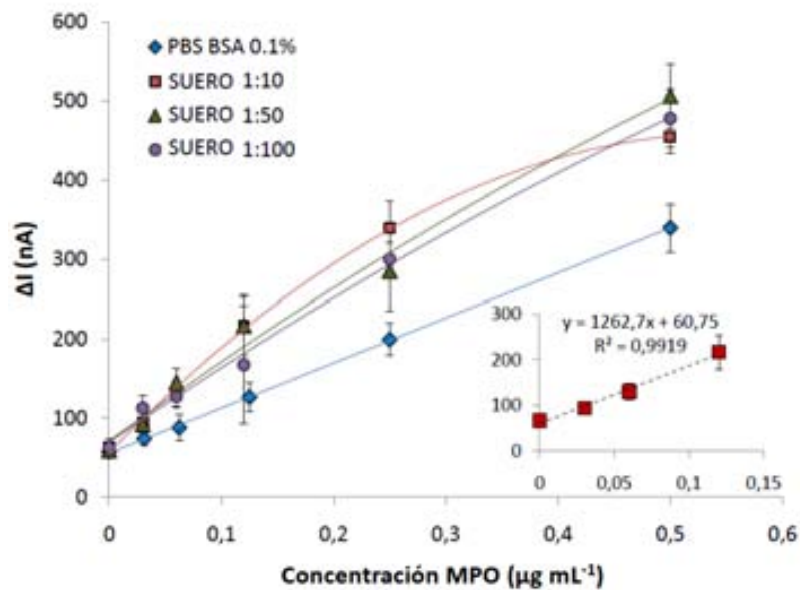


Figura 6.32.: Señales obtenidas con el inmunoensayo optimizado en PBS BSA 0.1 % o en suero humano diluido con concentraciones de MPO añadidas (Inserto) Amplificación de la curva de calibración obtenida en suero diluido 1:10 en el rango de concentraciones de MPO (0-0,12) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

En el caso del suero diluido 1:10 obtuvimos un LOD de $5,43 \text{ ng mL}^{-1}$ de MPO lo que corresponde a un LOD de $54,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de MPO en el suero pre-diluido. Como la concentración fisiológica de la MPO varía entre menos de 95 ng mL^{-1} en individuos sanos a más de 600 ng mL^{-1} en pacientes con enfermedades cardiovasculares [194], estos resultados confirman que el ensayo aquí presentado sería capaz de distinguir entre estos dos tipos de individuos.

6.4.6. Conclusiones

Como se ha mostrado anteriormente en la Tabla 6.5, el LOD obtenido en este trabajo (6 y $54,3 \text{ ng mL}^{-1}$ en PBS y en suero humano no diluido, respectivamente) es mayor que los LODs obtenidos por otros autores ($0,05\text{-}0,4 \text{ ng mL}^{-1}$ en PBS; [194, 235, 236, 237, 239, 240]). Sin embargo, y contrariamente al método de detección propuesto en este trabajo, todos estos trabajos basan la detección de MPO en la utilización de electrodos modificados con materiales compuestos mediante complejas estrategias de modificación de la superficie del electrodo, o de dispositivos microfabricados de gran calidad, lo que dificulta la producción en masa y la implementación en entornos de diagnóstico real. Por ejemplo, Venkatraman et al. [237] utilizan un microelectrodo fabricado por fotolitografía y nanoestructurado con nanohilos de óxido de iridio mediante la técnica de depósito de vapores químicos organometálicos (MOCVD), que entonces modifican con anticuerpos antiMPO mediante la reacción biotina-estreptavidina. Para detectar la MPO utilizan la espectroscopía de impedancia electroquímica, una técnica considerada más sensible pero que requiere un análisis de datos más complejo que la amperometría, y consiguen un LOD de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. El inmunoensayo cronoamperométrico presentado por Barallat et al. [194] dura 1 hora, emplea electrodos fabricados fotolitográficamente, incrementando el coste del ensayo y genera un LOD de $0,4 \text{ ng mL}^{-1}$. Finalmente, en los trabajos presentados por Lu et al. y Liu et al. [238, 239, 240] donde obtienen LODs de $0,05\text{-}0,2 \text{ ng mL}^{-1}$, los electrodos están modificados con multicapas de (nano)compuestos fabricadas mediante procesos complejos y de larga duración.

Al contrario, el inmunoensayo presentado en este trabajo utiliza PM, C-SPE y un substrato enzimático listo para usar, todos ellos de origen comercial. Esto, permite que el sistema de detección tenga un coste final limitado y pueda ser fácilmente reproducido por cualquier usuario potencial. El elevado LOD obtenido en las primeras etapas de optimización del ensayo se soluciona al implementar el conexionado de las PM con NTC. Esto permite alcanzar un LOD suficientemente bajo para poder realizar medidas en suero sanguíneo humano y genera resultados compatibles con la detección de individuos con riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

7. Nanoestructuración de electrodos de capa fina

7.1. Introducción

El método de nanoestructuración de superficies que se ha usado a lo largo de esta tesis, basado en el atrapamiento magnético de NTC [146, 147, 149], se desarrolló en parte con el objetivo de producir electrodos modificados con NTC que fueran fácilmente reutilizables. En este sentido, hay que recordar que el conexionado de los NTC con PM crea un compuesto PM/NTC, que es entonces atraído magnéticamente a la superficie del electrodo de trabajo con la ayuda de un imán. Una vez se retira el imán, los complejos de PM/NTC pueden ser fácilmente eliminados mediante pipeteo y el electrodo puede ser nanoestructurado y usado de nuevo. En el Capítulo 6, este método se ha aplicado a la nanoestructuración de electrodos serigrafados (SPE), consiguiendo una mejora significativa en la detección electroquímica de la DA y la MPO, respecto a las señales que se obtenían en los SPE no modificados. Sin embargo, la reutilización de SPE no es necesariamente una estrategia óptima. Estos electrodos son dispositivos baratos, concebidos para ser de un solo uso, por lo que se podría discutir si su calidad y coste justifican su reutilización en todas y cada una de las posibles aplicaciones. Es más, debido a la rugosidad de su superficie, especialmente en el caso de los C-SPE, una vez se han modificado con NTC, su limpieza y reutilización puede no ser trivial y requerir activación electroquímica. Debido a esto, se estudió si este método de nanoestructuración era también aplicable a microelectrodos de capa fina, fabricados en la sala blanca de IK4-Ikerlan, cuyo coste de producción es notablemente superior al de los SPE.

En este capítulo, primero se caracterizan los sensores fabricados en esta tesis y se demuestra su reproducibilidad y reutilización antes y después de la modificación de la superficie con PM/NTC. Luego, para analizar la aplicabilidad de estos sensores en distintas plataformas de ensayo, se analiza la nanoestructuración con NTC para la producción reversible de electrodos mejorados. En este caso, se realiza la detección de una molécula electroactiva de interés clínico como el ácido úrico (AU). Así conseguiremos la detección electroquímica directa del AU que se encuentra en la muestra sin realizar la captura previa del AU mediante las PM, como se ha hecho en las plataformas de detección presentadas con anterioridad. En estos electrodos de capa fina, también se realiza la nanoestructuración con NTC para la optimización de ensayos mediante el sensado directo de las PM al igual que en el Capítulo 6. En

este caso, se desarrolla un método distinto y novedoso de detección directa de analitos no electroactivos mediante el sombreado de las PM, previamente modificadas con ferroceno (PM-Fc). La captura del analito por las PM-Fc sombreada los Fc que se encuentran en la superficie de las PM, generando una disminución en la señal electroquímica de este marcador.

7.2. Caracterización de los sensores de capa fina modificados con NTC

7.2.1. Caracterización electroquímica

En este apartado se caracterizarán electroquímicamente los sensores fabricados en esta tesis y descritos en la Subsección 4.2.2, tanto antes como después de su modificación con NTC mediante atrapamiento magnético. Se trata de 2 tipos de dispositivos fabricados por técnicas fotolitográficas estándar sobre un sustrato de pyrex. Ambos incluyen tres electrodos, pero mientras en el primero de los casos estos son de platino (chip Pt; Figura 4.2.a), en el segundo se han producido electrodos de oro (cápsula Au; Figura 4.2.b). Aparte del material del WE, la principal diferencia entre los dos sensores es la geometría. Los dos tienen el WE del mismo tamaño, pero la distancia entre los electrodos RE-WE y CE-WE es mayor en el chip de Pt, como se puede observar en la Figura 4.2 y Figura 5.3. La modificación de los sensores con NTC se realiza mediante el procedimiento descrito en la Subsección 4.3.3, pero con ligeras modificaciones ya que el WE de estos dispositivos es más pequeño que el de los C-SPE usados en las secciones anteriores ($3,46 \text{ mm}^2$ respecto de C-SPE, $12,56 \text{ mm}^2$). Por lo tanto ha habido que reoptimizar las cantidades de PM y NTC que producían un recubrimiento y funcionamiento mejor del electrodo. De este modo, para la modificación de la superficie con NTC se utilizan $2 \mu\text{L}$ de PM (Dynabeads T1, $\phi = 1 \mu\text{m}$), lavadas y diluidas en $4 \mu\text{L}$ de PBS 10 mM , y se mezclan con $2 \mu\text{L}$ de PBS 3 veces concentrado (30 mM PBS) y $3 \mu\text{L}$ de NTC (SWCNT-COOH; 1 mg mL^{-1}).

Primero se analizó el comportamiento de los sensores sin modificar y modificados con PM/NTC mediante CV realizadas en ferrocianuro 5 mM . En las CVs se aplicó un barrido de $-0,3 \text{ V}$ a $0,5 \text{ V}$ vs Ag a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . En la Figura 7.1 se muestran algunas de las CVs obtenidas antes y después de la modificación de los sensores con PM y $3 \mu\text{L}$ de NTC, y en la Figura 7.2 se resumen las alturas de los picos de oxidación obtenidas en 4 medidas independientes. Por un lado, se ve como sin NTC la corriente medida en la cápsula de Au respecto al chip de Pt es un poco mayor. Por otro lado se ve como, para ambos sensores, aumenta la corriente de pico al modificar la superficie con NTC. Si analizamos la distancia entre los picos de oxidación y reducción de las CVs de la Figura 7.1, en los sensores sin NTC se obtienen $E = 86 \text{ mV}$ y 76 mV para la cápsula y el chip, respectivamente. Al modificar la superficie con PM/NTC la distancia disminuye ligeramente, obteniendo $E = 72 \text{ mV}$ y 73 mV para la cápsula y el chip, respectivamente.

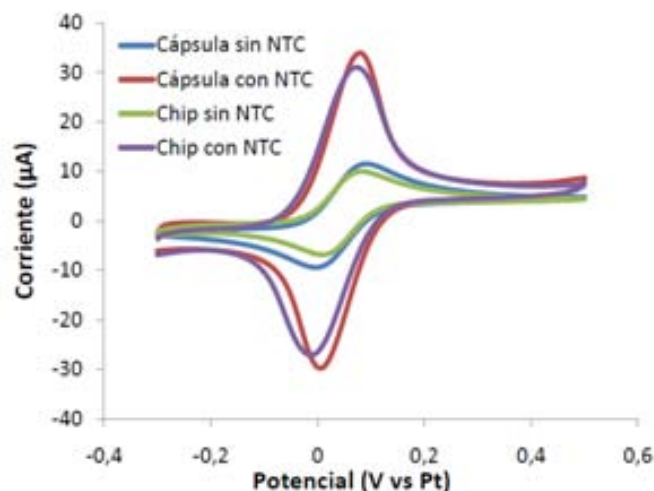


Figura 7.1.: CVs realizadas en ferrocianuro 5 mM en chip Pt y cápsula Au con y sin NTC.

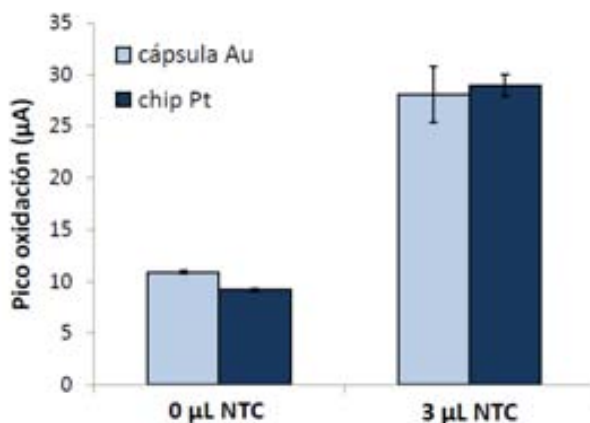


Figura 7.2.: Gráfica del pico de oxidación promedio obtenido en 4 medidas independientes de CVs en ferrocianuro 5 mM.

Como se comentó en la Subsección 3.4.2, si la cinética de transferencia de electrones está controlada por la difusión planar semi-infinita, la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 3.7) determina que, en el caso de reacciones reversibles, la corriente registrada es proporcional a $\nu^{1/2}$, donde ν es la velocidad de barrido. En la Figura 7.3 se ha representado la altura del pico de oxidación, registrada para ferrocianuro 5 mM en la cápsula de Au modificada y sin modificar con PM/NTC, respecto de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. En ambos casos vemos como la tendencia es lineal, con un $R^2 = 0.99$ para el sensor sin NTC y un $R^2 = 0.987$ para el sensor con NTC. El hecho de que el ajuste sea ligeramente peor para los sensores modificados con NTC es coherente con los resultados publicados por Streeter et al. [131], que observaron como en electrodos recubiertos de capas semiporosas de NTC la cinética

de transferencia de electrones no solo dependía de la difusión planar semi-infinita, sino que había que tener en cuenta un parámetro adicional debido a la porosidad de la superficie de la capa de NTC. Este parámetro es la difusión de las capas finas y se forma cuando pequeños volúmenes de solución quedan atrapados entre las capas de los NTC y la superficie del electrodo.

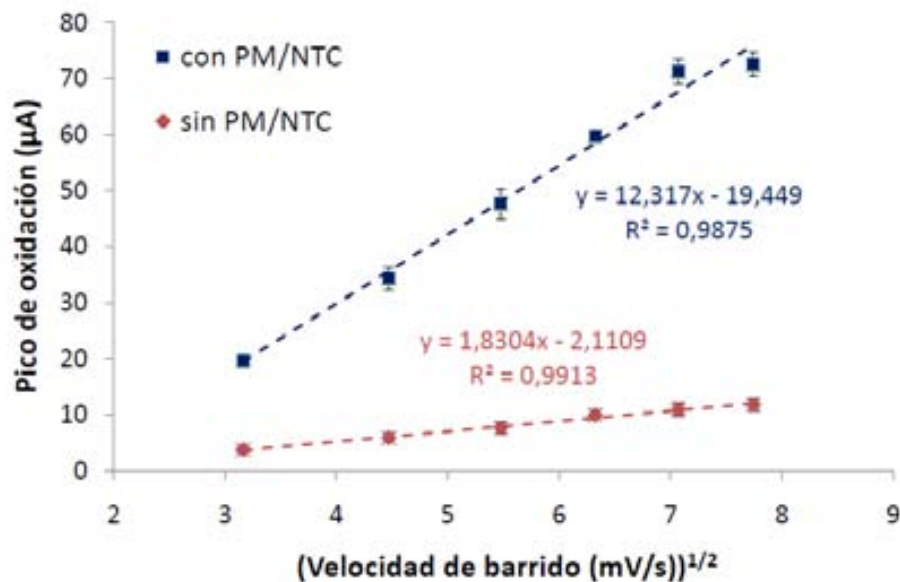


Figura 7.3.: Pico de oxidación de ferrocianuro medido para distintas velocidades de barrido en sensores de Au (cápsula Au) modificados con PM/NTC y sin modificar.

7.2.2. Regeneración y reutilización del electrodo

Por otro lado, se ha hecho un análisis de la reproducibilidad y reutilización de los sensores después de haber sido modificados con PM/NTC. Como se ha comentado en la Sección 4.3, el método de nanoestructuración de superficies presentado en este trabajo permite la nanoestructuración reversible de los electrodos. Con el objetivo de demostrar la reversibilidad y reproducibilidad del procedimiento, se han obtenido series de CVs en ferrocianuro 5 mM en un mismo sensor, pero alternando entre medidas con la superficie sin modificar con PM/NTC y con la superficie modificada con PM/NTC. En todos los casos, entre medidas se eliminaba el sedimento de PM/NTC cuando este existía, se lavaba el dispositivo con agua destilada y se realizaba una activación electroquímica, realizando CVs entre 0-1,4 V en H_2SO_4 50 mM (Subsección 4.5.1). En la Figura 7.4 se muestran los picos de oxidación registrados en estas medidas (a) y los potenciales de oxidación de los picos medidos (b). Las líneas y sombreados horizontales ilustran en las gráficas los valores promedio obtenidos y los intervalos de 3 veces su desviación estándar (3σ). Estos resultados demuestran la estabilidad de los sensores y la reversibilidad de la nanoestructuración por atrapamiento magnético de NTC, ya que no se observa que la modificación del sensor

produzca un pasivado de la superficie. Además, la reproducibilidad entre medidas independientes es buena, obteniéndose unos coeficientes de variación (% CV) del 4,6 y 4,9% para los picos de oxidación del sensor sin PM/NTC y con PM/NTC, respectivamente. El potencial de oxidación también es reproducible, obteniéndose unos coeficientes de variación (% CV) del 5,03 y 11,7% para el sensor sin PM/NTC y con PM/NTC, respectivamente.

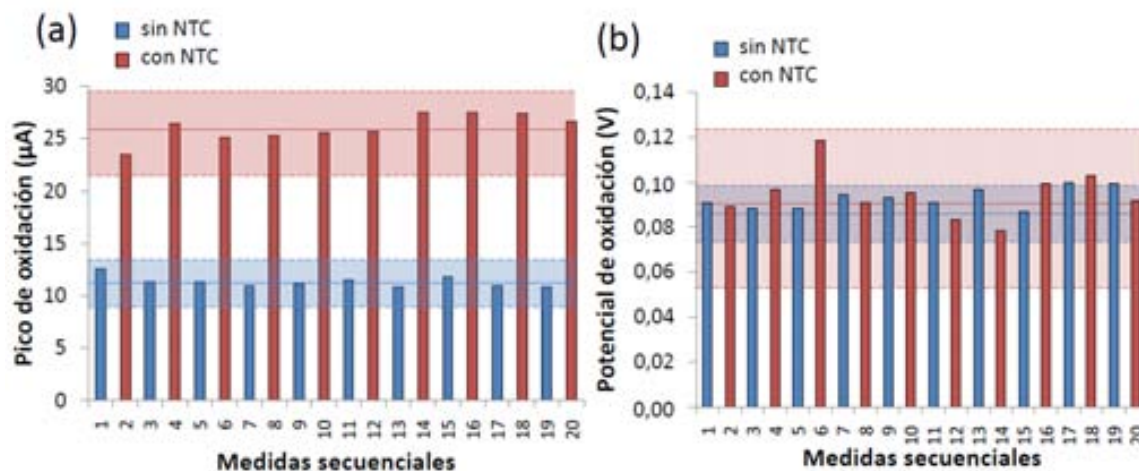


Figura 7.4.: Serie de CVs realizadas en ferrocianuro 5 mM usando una misma cápsula de Au, intercalando medidas con y sin nanoestructuración de la superficie con PM/NTC. (a) Picos de oxidación medidos. (b) Potenciales de oxidación.

La caracterización de los sensores se completó con medidas de espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS) en ferrocianuro 5 mM (Subsección 3.4.3). Los parámetros de la EIS analizados en este trabajo son la R_s , la R_{ct} y la C_{dl} , que se calcularon utilizando el software NOVA 1.8 del Autolab. El análisis de EIS se realizó en el rango de frecuencias de 0.1 Hz-100 kHz a 0 V y aplicando un voltaje de excitación de 10 mV. El espectro obtenido en la medida se analizó haciendo un ajuste con el circuito equivalente de Randles que se muestra en la Figura 7.5. A continuación se analizarán los parámetros citados uno a uno.

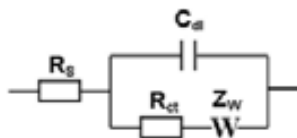


Figura 7.5.: Circuito equivalente Randles usado para el ajuste de las medidas obtenidas por EIS para la caracterización de dispositivos modificados o no con NTC.

La resistencia de la solución (R_s) depende de la concentración iónica, el tipo de iones, la temperatura y el área del sensor por el que fluye la corriente. Un potencióstato conectado a una celda de medida de 3 electrodos compensa la resistencia

de la solución entre el electrodo de referencia y el contraelectrodo. Sin embargo, la resistencia de la solución entre el electrodo de trabajo y el de referencia es un factor a tener en cuenta en las celdas electroquímicas. Debido a las distintas geometrías del chip de Pt y de la cápsula de Au, las R_s obtenidas de las EIS de estos dos sensores difieren. Así mientras la R_s obtenida en la cápsula es de 21,8 Ω , en el chip es de 81,2 Ω debido a la mayor distancia entre los electrodos, que se traduce en una mayor resistencia. Esto explicaría porque en la Figura 7.2, en el caso de la cápsula sin NTC se miden picos ligeramente más altos que en el chip sin NTC.

La polarización de un electrodo causa que la corriente producida por reacciones electroquímicas que ocurren en su superficie fluya. La resistencia de polarización o de transferencia de carga (R_{ct}), está relacionada con la resistencia que ofrece la interfase electrodo/solución al paso de este flujo de electrones. Como se puede observar en la Figura 7.6, la R_{ct} disminuye al modificar la superficie del WE con NTC. Esta disminución implicará un mayor flujo de corriente, de acuerdo con la ecuación de Butler-Volmer simplificada (Ecuación 3.10), lo que concuerda con el resultado mostrado en la Figura 7.2 y con las observaciones de otros autores.

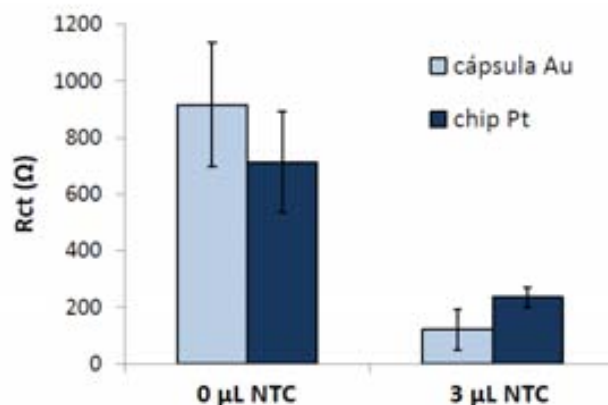


Figura 7.6.: R_{ct} s obtenidas en las medidas de EIS realizadas en ferrocianuro 5 mM tras el ajuste usando el circuito de Randles de la Figura 7.5.

Respecto a la capacitancia de la doble capa eléctrica (C_{dl}), se origina cuando iones de la solución se concentran en la superficie de un electrodo polarizado para compensar los iones de carga contraria expuestos en la superficie del mismo. Aquí, la C_{dl} se ha calculado con un promedio de los valores de capacitancia obtenidos para las frecuencias en las que habitualmente se trabaja en las medidas electroquímicas (10-50 Hz). Como es de esperar, al añadir los NTC aumenta la capacitancia porque la adición de NTC a un electrodo aumenta la rugosidad de la superficie y, por lo tanto, el área efectiva. En este sentido, se sabe que la capacitancia es proporcional al área (Figura 7.7). Por otro lado, si el valor de C_{dl} disminuye habrá una disminución de la corriente de fondo. Por eso, como vemos en las CVs de la Figura 7.1, cuando se modifica la superficie del electrodo con NTC la corriente de fondo aumenta. Para

finalizar con el análisis, la C_{dl} de la cápsula de Au es ligeramente inferior que la del chip de Pt, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores, que han defendido que la superficie de Pt es más rugosa que la de Au [242].

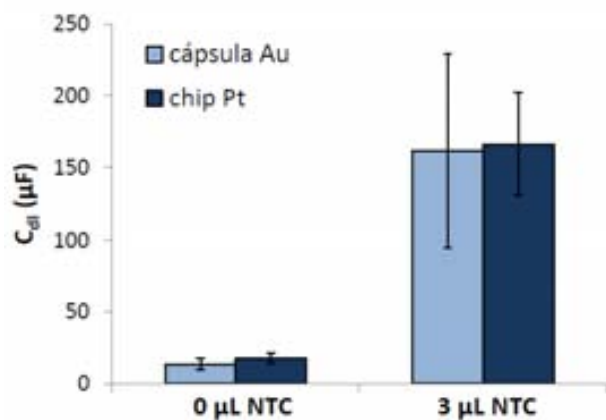


Figura 7.7.: C_{dl} s promedio calculados para el rango de frecuencias 10-50 Hz de las EIS realizadas en ferrocianuro 5 mM.

Los resultados obtenidos en esta caracterización concuerdan con el análisis realizado previamente por Olivé-Monllau et al. [149], que analizaron la nanoestructuración del WE de SPE con distintas cantidades de PM y NTC y, también, con distintos tipos de PM Dynabeads de Invitrogen.

7.3. Detección de moléculas electroactivas en solución: aplicación a la detección de ácido úrico (AU)

7.3.1. Descripción y justificación del bioensayo

El procedimiento planteado en este capítulo, el atrapamiento magnético de PM/NTC en electrodos de capa fina, se ha aplicado a la detección de dianas electroactivas presentes en solución. Para ello, se ha realizado la detección del ácido úrico mediante la nanoestructuración de electrodos de capa fina, que han sido regenerados y reutilizados exitosamente a lo largo del tiempo de manera reproducible.

El AU es un compuesto orgánico cuya fórmula química es $C_5H_4N_4O_3$. En humanos el AU es el producto de desecho final del metabolismo de las purinas de los ácidos nucleicos (adenosina y guanosina) y se excreta, mayoritariamente, mediante la orina. La monitorización del AU en la orina sirve para diagnosticar ciertas enfermedades. Por ejemplo, la hiperuricemia, o concentración alta de AU, puede ser sintomática de un aumento en la producción de AU o una disminución de excreción renal del mismo, y está relacionada con la enfermedad de la gota, con el síndrome Lesh-Nyhan y con enfermedades renales crónicas. Por el contrario la hipouricemia, o concentración baja de AU, puede ser el resultado de una disminución en la síntesis de proteínas o de un defecto en la reabsorción tubular renal del AU. Estos efectos se han relacionado con varias enfermedades del hígado y con el síndrome de Fanconi.

Sin embargo, e independientemente del estado de salud de un individuo, la concentración de AU en orina puede variar mucho de muestra a muestra y a lo largo del día. Por este motivo, a efectos diagnósticos, la cuantificación electroquímica del AU en orina se realiza habitualmente mediante el análisis de la orina recogida a lo largo de 24 horas. Está establecido que los valores fisiológicos normales van desde 200 a 2000 mg de AU en 24 horas [243]. Por tanto es difícil hacer una equivalencia entre los valores de AU medidos con nuestro sistema y los datos clínicos referidos en la bibliografía. Según Lakshmi et al. [244] los valores fisiológicos normales del AU son de alrededor de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en orina y $1.2 - 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en sangre, aunque pueden variar según los hábitos alimentarios de cada individuo o tras la ingesta de algunos fármacos, alcohol y ciertos alimentos.

7.3.2. Optimización de la detección electroquímica del AU

En este trabajo, la detección electroquímica del AU se hizo mediante CV en PBS a pH 7,4. Como se puede observar en la Figura 6.10 y Figura 6.11, en estas condiciones experimentales el AU experimenta una oxidación irreversible y su CV presenta un pico de oxidación detectable, pero un pico de reducción inapreciable. Por lo tanto,

se analizó el pico de oxidación o corriente anódica de la CV del AU, que se genera alrededor de 0,1 V vs Pt en los electrodos nanoestructurados.

Las medidas se hicieron en sensores de Au fabricados en la sala blanca de IK4-Ikerlan (Figura 5.3) y las cantidades de PM y NTC que se utilizaron para nanoestructurar la superficie de Au se optimizaron para sensores de este formato. Al igual que se hizo con las medidas de ADN de la Sección 5.3, el objetivo de esta parte del trabajo fue trasladar posteriormente las medidas hechas en el sensor de Au al cartucho microfluídico (Capítulo 8). Como se trataba de desarrollar un sistema de detección portable, las medidas se hicieron con el potencióstato desarrollado en IK4-Ikerlan (Sección 4.4).

Reutilización y reproducibilidad del método de detección

A nuestro juicio, una de las principales ventajas del método de modificación descrito en este trabajo es que permite la nanoestructuración reversible del sensor, haciendo posible su reutilización de manera reproducible. Por el contrario la práctica totalidad de los trabajos descritos en la literatura describen la nanoestructuración de la superficie del sensor de manera irreversible [245, 246]. En este sentido, se realizó un experimento en el que se sometió un electrodo de Au repetidamente a la modificación con PM/NTC y eliminación de los mismos, obteniendo CVs a una concentración fija de AU después de cada modificación (sensor con NTC) y de cada regeneración (sensor sin NTC). En la Figura 7.8.a se resume la altura del pico de oxidación calculada en las 20 CVs consecutivas, realizadas a una velocidad de barrido de 40 mV s^{-1} en $500 \mu\text{M}$ de AU. Las líneas y sombreados horizontales de la figura representan los valores promedio de cada serie de valores y el intervalo de 3 veces su desviación estándar (3σ). A pesar de que estas medidas se hicieron en un mismo sensor de Au, alternando medidas con el sensor sin modificar y modificado con PM/NTC, los resultados fueron muy reproducibles, obteniéndose unos coeficientes de variación (% CV) del 7,6 y 11,9% para sensores sin y con NTC, respectivamente. En la Figura 7.8.b se ve el potencial de oxidación de AU medido en estas CVs donde, como ya se ha observado anteriormente, la modificación de la superficie con NTC genera un desplazamiento del pico hacia potenciales más cercanos a 0 V vs Pt y una disminución en la distancia entre los picos de oxidación y reducción [149]. La reproducibilidad del potencial de oxidación también es buena, obteniéndose un % CV del 6,7 y 13,5% para sensores sin y con NTC, respectivamente.

Detección electroquímica de AU en PBS

A continuación, pasó a estudiarse el comportamiento del AU en los electrodos de Au sin modificar y tras su nanoestructuración. La Figura 7.9 muestra las CVs obtenidas para concentraciones crecientes de AU ($0\text{-}1000 \mu\text{M}$) preparadas en PBS 10 mM a pH 7.4, en ambos tipos de materiales. Como se puede observar, mientras el pico de

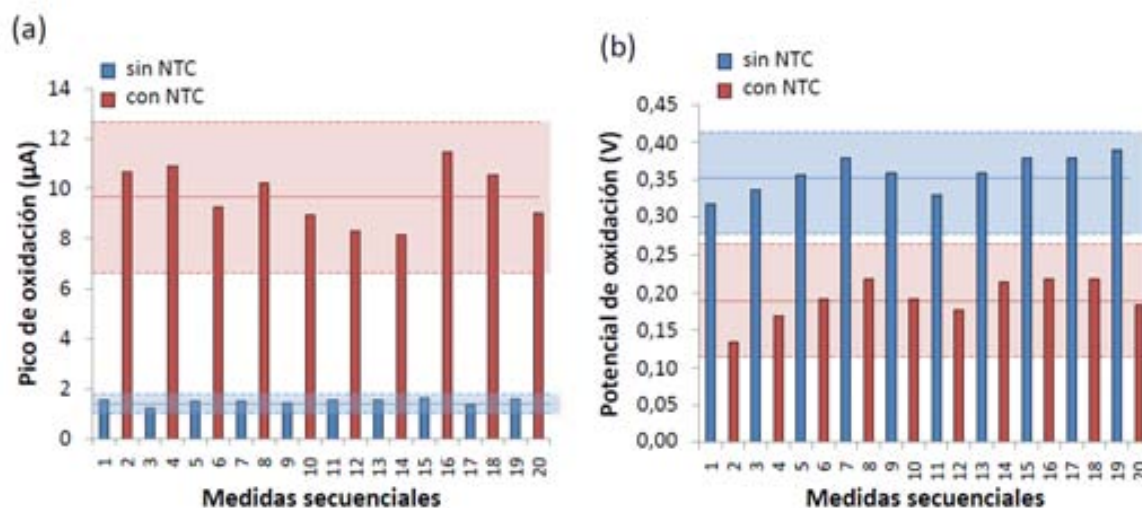


Figura 7.8.: Estudio de la reproducibilidad y reversibilidad del método de nanoestructuración de electrodos de capa fina aplicado a la detección de AU en solución. (a) Altura de los picos de oxidación medidos para $500 \mu\text{M}$ de AU en 20 CVs realizadas consecutivamente en un mismo sensor de Au, intercalando la utilización del sensor modificado con NTC y sin NTC. (b) Potencial de oxidación de AU $500 \mu\text{M}$ en estas mismas 20 CVs realizadas consecutivamente en un mismo sensor de Au con y sin NTC.

oxidación del AU aparece en los sensores de Au a un potencial alrededor de $0,35 \text{ V vs. Pt}$, el pico se desplaza a potenciales sobre los $0,15 \text{ V vs. Pt}$ cuando se usan los electrodos nanoestructurados, un efecto que ya había sido descrito anteriormente [149]. Por otro lado, si se representa la altura del pico de oxidación obtenido para $500 \mu\text{M}$ de AU medido en sensores modificados con NTC respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, vemos que la tendencia es lineal. Esto es característico de los procesos limitados por difusión y nos indica que el AU no se adsorbe sobre la superficie del sensor a lo largo de la medida (Figura 7.10).

En la Figura 7.11 se reproducen las rectas de calibración obtenidas en sensores sin modificar y modificados con NTC. Si se comparan las altura de pico registradas, los valores obtenidos en los sensores modificados son en promedio hasta 7 veces mayores que los generados en el sensor de Au, lo cual puede atribuirse parcialmente al incremento en el área efectiva del sensor aportado por los NTC. Si se analiza la recta de calibración obtenida en sensores sin modificar con NTC (Figura 7.11.a), el LOD (3σ) es de $38 \mu\text{M AU}$ y el LOQ (10σ) de $58 \mu\text{M AU}$. En el caso de la recta de calibración obtenida en sensores modificados con NTC (Figura 7.11.b), el LOD (3σ) es de $0,86 \mu\text{M}$ de AU y el LOQ (10σ) de $1,9 \mu\text{M}$ de AU. Por lo tanto, la modificación del sensor con NTC genera una gran mejora en la sensibilidad de detección de AU. En este sentido, el LOD obtenido en este trabajo usando electrodos de capa fina de Au sin NTC es peor que el que obtienen otros autores en los distintos trabajos que se encuentran en la literatura usando dispositivos de materiales derivados del carbono (Tabla 7.1). Sin embargo, tras la nanoestructuración de la superficie esos

7.3 Detección de moléculas electroactivas en solución: aplicación a la detección de ácido úrico (AU)

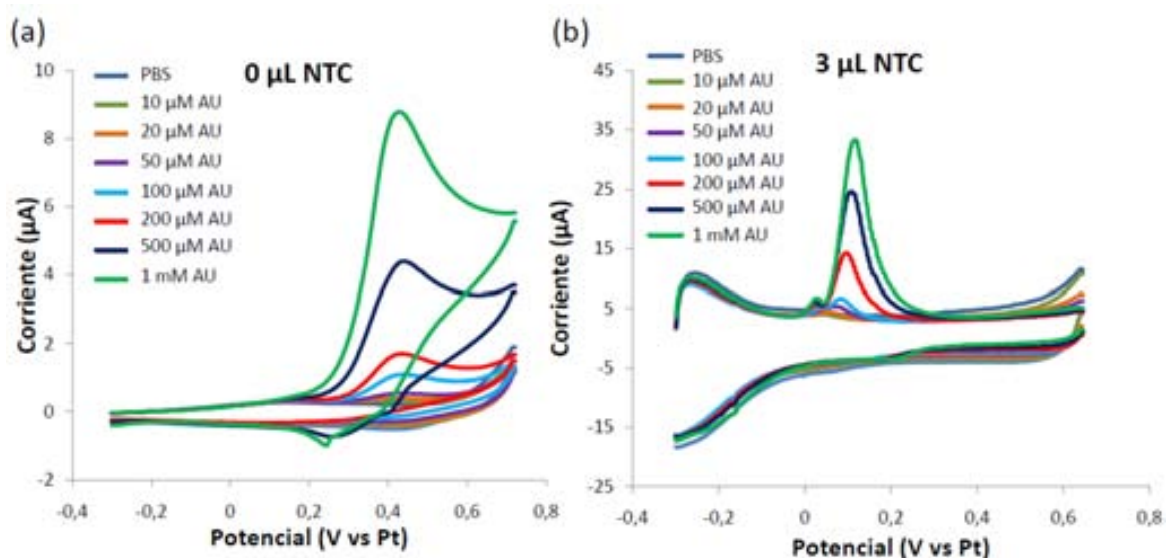


Figura 7.9.: CVs obtenidos para distintas diluciones de AU en (a) sensor de Au sin NTC y (b) sensor de Au con NTC.

mismos electrodos de capa fina generan un LOD de $0,86 \mu M$ AU, que es mejor que el de la mayoría de los trabajos decritos.

Sensor	Rango lineal	LOD	Medidas en orina	Ref.
Grafeno dopado con nitrogeno	0,1-0,25 mM	0,1 mM	No	[247]
Electrodo de carbono nanoporoso	10-70 M	1,6 M	17,5 M de AU endógeno en orina diluida	[248]
Grafeno oxidado	0,3-100 M	0,3 M	Dilución 1:100, 14,6 y 18,6 M de AU	[249]
GCE modificado con tratamiento electroquímico	5-70 M	4,70 M	Dilución 1:100, 24,13 M de AU	[250]
Fibras de carbono con graphene flowers	3,78-183,87 M	2 M	No detectan AU endógeno	[245]
Electrodo de carbono con grafeno y AuNP	12,6-413,62 M	12,6 M	No	[246]

Tabla 7.1.: Artículos de detección electroquímica de AU publicados por otros autores.

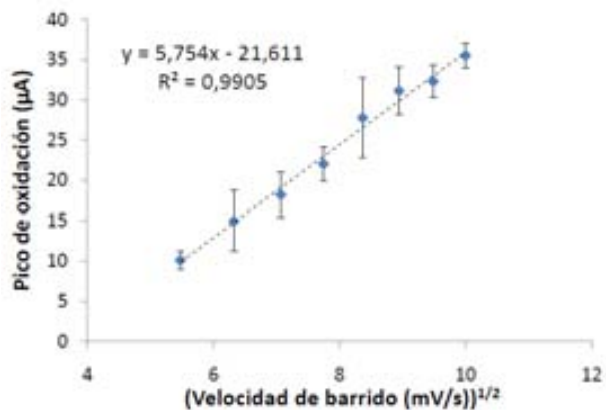


Figura 7.10.: Picos de oxidación de AU 500 μM en CVs realizadas en sensores de Au modificados con NTC a distintas velocidades de barrido (30-100 $mV s^{-1}$).

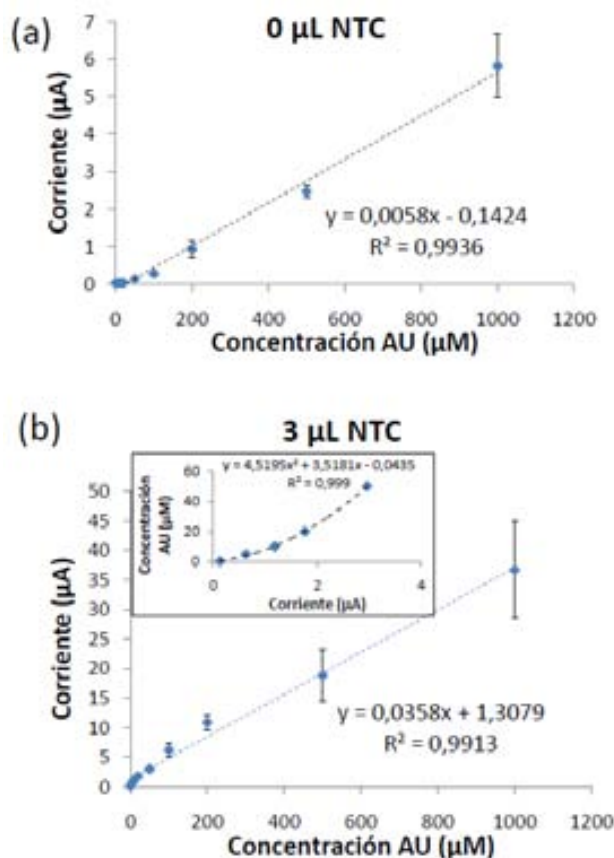


Figura 7.11.: Recta de calibración obtenida para la detección por CV de distintas concentraciones (0-1000 μM) de AU en PBS usando sensores de Au (a) sin modificar con NTC o (b) modificados por atrapamiento magnético con 3 μL de NTC (Inserto) Gráfica para el cálculo del LOD (0-3 μM) de AU.

7.3.3. Comparación del potenciostato de IK4-Ikerlan con Autolab

Una vez demostrado el buen funcionamiento, la reutilización y la reproducibilidad de la nanoestructuración de los electrodos de capa fina en la detección del AU, procedía verificar el funcionamiento del potenciostato de IK4-Ikerlan. Para ello, se prepararon distintas diluciones de AU en PBS y se midieron en paralelo en los dos potenciostatos utilizando sensores de Au modificados y sin modificar con NTC. Los resultados de estos experimentos han sido resumidos en la Figura 7.12.

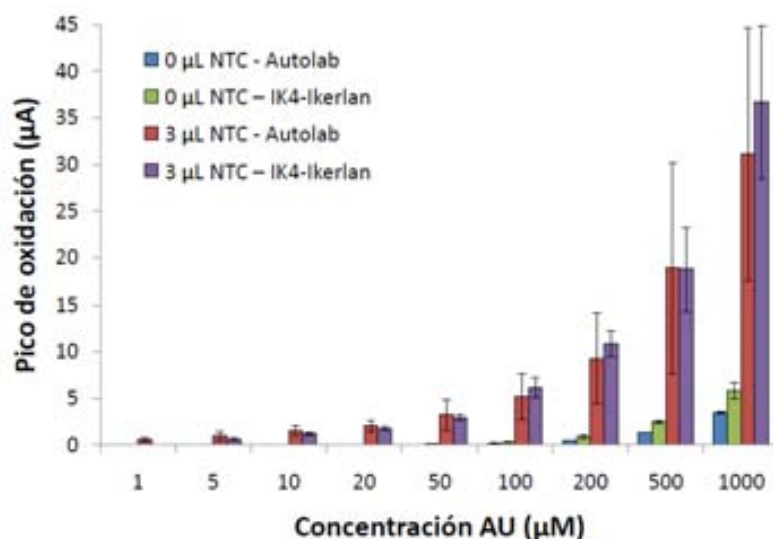


Figura 7.12.: Picos de oxidación de AU en las CVs obtenidas en un equipo comercial Autolab (azul, rojo) y en el potenciostato de Ikerlan (verde, morado) usando electrodos de Au modificados con y sin NTC.

Como se puede comprobar en la Figura 7.12, los resultados promedio obtenidos con el potenciostato desarrollado en IK4-Ikerlan son muy similares a los obtenidos con el Autolab. Sin embargo, si nos fijamos en las barras de error, las medidas realizadas en el Autolab han resultado ligeramente menos reproducibles. La razón principal es que el sensor de Au usado para estos experimentos ha sido especialmente diseñado para ser insertado en un puerto conector del potenciostato de Ikerlan, lo cual facilita su utilización y reduce el cableado. Por lo tanto, para la conexión del sensor al Autolab ha sido necesario producir conectores especiales y usar cables más largos, aumentando la corriente de fondo y empeorando la reproducibilidad de las medidas. Independientemente de esto, en todos los casos se observa un aumento significativo de las alturas de los picos de oxidación registrados para el AU cuando se usan electrodos nanoestructurados. Como ya se había observado, los sensores modificados con NTC son capaces de detectar concentraciones significativamente menores de AU que los sensores de Au sin modificar. En estos experimentos es destacable que con el

potenciostato desarrollado en IK4-Ikerlan se han podido medir concentraciones de AU más bajas que las medidas con el Autolab, tanto con los sensores modificados con NTC como con los sensores de Au sin modificar. En vista de los resultados obtenidos, el resto de los experimentos se llevaron a cabo usando el potenciostato de IK4-Ikerlan.

7.3.4. Medidas de AU en matrices de muestra compleja

El AU coexiste con varios compuestos que interfieren en su detección electroquímica en las muestras biológicas. De entre ellos, los principales interferentes suelen ser la dopamina (DA) y el ácido ascórbico (AA), ya que estos dos compuestos también son electroactivos y sus potenciales de oxidación están muy cerca del potencial de oxidación del AU para electrodos de los materiales más usados. Sin embargo, y como ya se ha descrito en la Subsección 6.2.2, cuando se mide la DA en presencia del AA y del AU usando un sensor modificado con PM/NTC, no se observa el pico de oxidación del AA y solo se detectaban los picos de oxidación de la DA y del AU. Del mismo modo, Huang et al. [251] observaron que, al modificar la superficie del electrodo con SWCNT-COOH, mejoraba el comportamiento electroquímico del AU, pero no el del AA. Por otro lado, las cantidades normales de DA y AU que se miden en los tests de orina analizada en 24h están en el rango de 65-400 μg y 250-750 mg , respectivamente. Por lo tanto, en el caso más desfavorable, el ratio $[AU] [DA]$ es de 625. De acuerdo con estas observaciones, no se esperaba que el AA y la DA interfirieran de forma importante en la detección de AU cuando se usaran electrodos nanoestructurados. No obstante esta posibilidad se estudió como se describe a continuación.

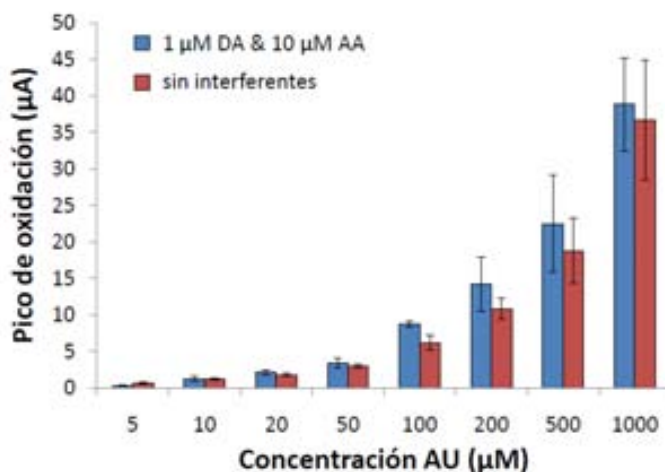


Figura 7.13.: Picos de oxidación de AU medidos en presencia y en ausencia de 1 μM de DA y 10 μM de AA.

En nuestro caso, el efecto de los interferentes se analizó realizando unas medidas

de distintas concentraciones de AU en ausencia y en presencia de $10 \mu M$ de AA y $1 \mu M$ de DA. En la Figura 7.13 se ve como la presencia de interferentes a estas concentraciones aumenta ligeramente el pico de oxidación del AU. No obstante, el AU se sigue detectando bien en todo el rango de concentraciones de AU analizado ($5-1000 \mu M$ AU), obteniéndose un LOD (3σ) de $2,5 \mu M$. El ligero aumento del pico de oxidación del AU en presencia de interferentes también fue observado por Huang et al. [251], quienes comprobaron cómo al aumentar la cantidad del AA en la muestra aumentaba ligeramente el pico de oxidación del AU.

Medidas de AU en orina

Finalmente, para demostrar la aplicabilidad del método de detección descrito se hicieron pruebas en muestras reales de orina. Para ello, se analizó la concentración de AU endógeno y, también, el efecto matriz de la muestra en la detección de AU. Para cada uno de los experimentos realizados se usó orina obtenida el mismo día, que se había filtrado y centrifugado para eliminar agregados y/o bacterias potencialmente presentes. A continuación, se diluía la orina con PBS (1:10, 1:50, 1:100 ó 1:200) y se añadían concentraciones conocidas de AU a estas diluciones. Finalmente, se estudiaron estas preparaciones por CV y se compararon los picos de oxidación registrados para las distintas concentraciones de AU con los picos obtenidos para esas mismas concentraciones preparadas en PBS. En la Figura 7.14 se resumen los picos de oxidación medidos en PBS y en distintas diluciones de orina para cada concentración final de AU. Como se muestra en el inserto de la Figura 7.14, las muestras de orina generaron picos atribuibles a AU, incluso cuando no habían sido inoculadas con AU exógeno. Es más, cuanto menos diluida estaba la orina, mayor era el pico de AU que se detectaba a $0 \mu M$ de AU añadido, lo cual indicaba que se estaba detectando el AU endógeno. Independientemente de esto, en general la adición de concentraciones crecientes de AU a las muestras de orina resultaba en un incremento proporcional de la altura de pico registrada. La excepción era el caso de la orina menos diluida (1:10), en que la adición de AU no genera incrementos proporcionales del pico de oxidación registrado. Esto podría ser debido, en parte, a que la cantidad de AU endógena que se encuentra en la orina 1:10 es mayor que la mayoría de las concentraciones añadidas y enmascara las señales potencialmente generadas por las mismas.

A partir de los datos obtenidos se intentó hacer una estimación aproximada de la concentración de AU endógeno presente en las distintas muestras de orina estudiadas. Para ello se interpolaron las alturas de pico promedio atribuidas a AU endógeno en cada muestra de orina diluida (Figura 7.14, inserto) en el calibrado obtenido en PBS (Figura 7.15). De esta forma se obtuvieron concentraciones de $58 \mu M$, $63,4 \mu M$ y $14,5 \mu M$ para las muestras de orina diluidas 1:10, 1:50 y 1:100, respectivamente, que equivale a una concentración de AU endógeno en el rango $580 \mu M - 3 mM$ en la orina sin diluir. Al interpretar estos datos, hay que tener en cuenta que, como se había comentado anteriormente, la muestra de orina para la obtención de cada

uno de los calibrados es distinta y se sabe que factores externos, como la dieta y el ejercicio físico, pueden alterar los valores de AU en orina.

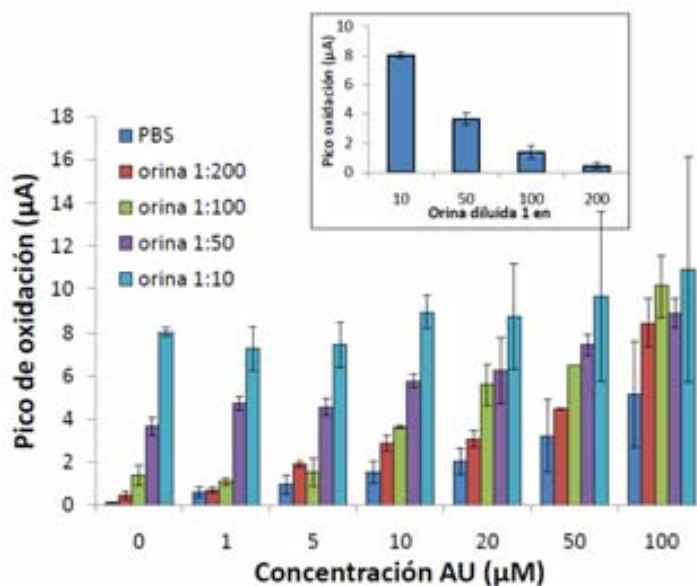


Figura 7.14.: Alturas de picos de oxidación obtenidas por CV en PBS y en distintas diluciones de orina, después de inocular concentraciones similares de AU. (Inserto) Medidas de AU endógeno en distintas diluciones de orina.

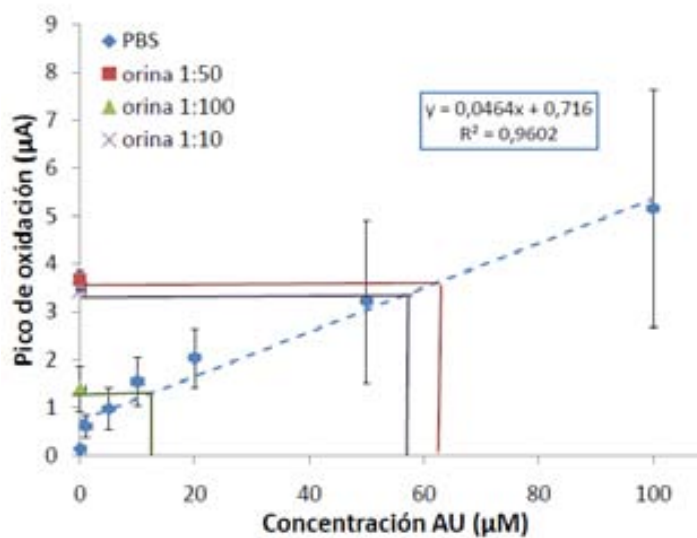


Figura 7.15.: Análisis de detección del AU endógeno en distintas diluciones de orina mediante la interpolación de los valores de altura de pico registrados por CV para cada dilución en la recta de calibración de AU obtenida en PBS.

Si comparamos los valores obtenidos aquí con las concentraciones de AU medidas por otros autores en muestras de orina (Tabla 7.1) vemos que para una dilución de orina 1:100 se reportan concentraciones de AU endógena de 14,6 a 24,3 μM AU [249, 250], lo que correspondería a 1,4-2,4 mM de AU en la orina pre-diluida. Esto concuerda con nuestras medidas si analizamos la dilución 1:100, que apuntan a una concentración de 1,4 mM de AU en la orina pre-diluida. Estos valores de AU endógeno en orina también coinciden con los descritos por Lakshmi et al. [244], que detallaba que el valor fisiológico del AU en orina de individuos sanos es de 2 mM AU.

Reutilización de sensores y reproducibilidad de las medidas en orina

La eficiencia de reutilización y reproducibilidad de los sensores, que se ha analizado en la Sección 7.3.2, cobra especial importancia en las medidas en orina, una matriz de muestra mucho más compleja que una simple solución salina. En la bibliografía existen un buen número de ejemplos que demuestran que los electrodos modificados con NTC sufren niveles bajos de adsorción inespecífica y pueden ser reutilizados a lo largo del tiempo. En nuestro caso, hemos estudiado esta posibilidad reutilizando la superficie nanoestructurada con PM/NTC para obtener de forma consecutiva medidas intercaladas de 5 μM y 100 μM de AU inoculado en orina 1:50. El procedimiento que se ha seguido es el siguiente: primero se mide 5 μM de AU (medida 1), luego, tras lavar la superficie con PBS se mide 100 μM de AU (medida 2), se vuelve a lavar la superficie con PBS y se mide de nuevo 5 μM de AU (medida 3), etc.

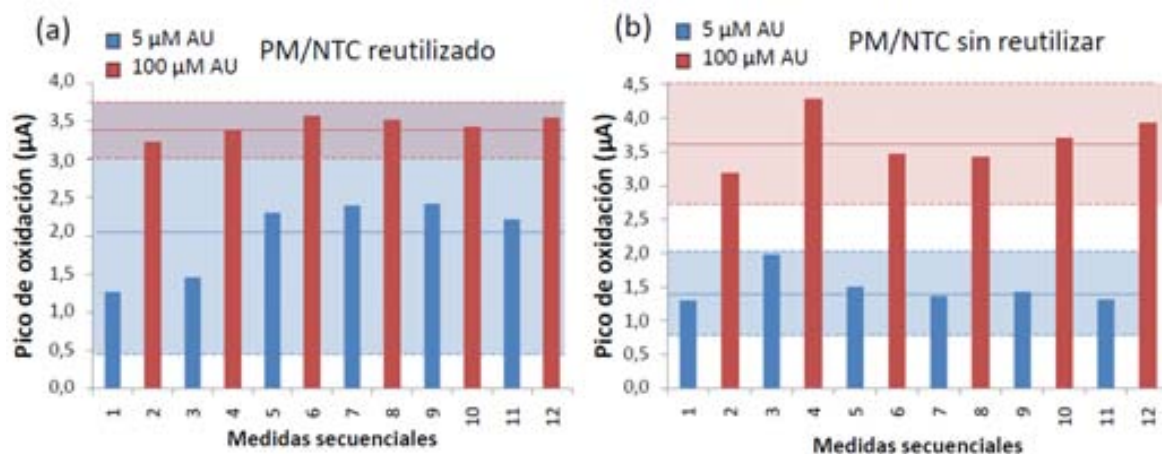


Figura 7.16.: Medidas intercaladas de AU 5 μM y 100 μM realizadas en orina 1:50 (a) con la superficie nanoestructurada PM/NTC reutilizada y (b) cambiando en cada medida la superficie nanoestructurada PM/NTC.

Como se observa en la Figura 7.16.a, las medidas secuenciales de AU 100 μM resultan muy reproducibles a lo largo del tiempo. Sin embargo a partir de la tercera

medida resulta evidente que la superficie se va contaminando, posiblemente con restos de solución que quedan atrapados en la matriz semi-porosa de PM/NTC, y las medidas de $5 \mu M$ AU empiezan a generar un pico más alto a cada medida (Figura 7.16.a). Como en los casos anteriores, el sombreado horizontal de la figura muestra 3 veces la desviación del valor promedio de las medidas (3). Para este experimento los sombreados de las medidas de $5 \mu M$ y $100 \mu M$ de AU se solapan. Sin embargo, si en lugar de reutilizar la cubierta de PM/NTC modificamos la superficie del sensor de Au con una nueva capa de PM/NTC para cada medida, este efecto de contaminación desaparece. Como se muestra en la Figura 7.16.b, aunque la detección de AU $100 \mu M$ usando un nuevo recubrimiento de PM/NTC cada vez es más variable, esta estrategia genera una mayor precisión a la hora de detectar una concentración de AU menor.

7.3.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos han confirmado que es posible aplicar el atrapamiento magnético de NTC a la nanoestructuración reversible de electrodos de capa fina, para lo que hay muy pocos protocolos descritos hasta el momento. Estos electrodos de capa fina nanoestructurados han sido empleados para la detección en solución de AU. La nanoestructuración de la superficie del electrodo ha generado una disminución en el LOD de AU, donde este es de $38 \mu M$ en sensores sin modificar y disminuye a $0,86 \mu M$ en sensores nanoestructurados. Además, se ha mostrado que se trata de una nanoestructuración de la superficie del electrodo reversible y reproducible y se ha recalcado y demostrado la necesidad de regenerar las superficies nanoestructuradas cuando se realizan medidas en matrices de muestra compleja. De este modo, se han realizado unas medidas preliminares de detección de AU endógeno en orina, obteniéndose unos resultados que concuerdan con lo esperado de la literatura.

Finalmente, se ha demostrado el buen funcionamiento del potenciostato desarrollado en IK4-Ikerlan en la realización de estas medidas.

7.4. Biosensado directo de dianas no electroactivas por sombreado superficial

7.4.1. Descripción y justificación del ensayo

En estos electrodos de capa fina, también se ha explotado con éxito la nanoestructuración con NTC para la optimización de ensayos mediante el sensado directo de las PM. Como se ha detallado en la Subsección 4.3.2, el marcado de PM con marcadores electroactivos, como el ferroceno (Fc), permite la detección de dianas no electroactivas. En el esquema de la Figura 7.17 se ilustra como cuando las PM-Fc atrapan el analito de la muestra, el analito sombrea parte de las unidades que se encuentran en la superficie de las PM-Fc. A nivel de la detección, esto se traduce en una disminución de la señal electroquímica del Fc. Los resultados de esta parte del trabajo han sido publicados en la revista *The Analyst* ([241] y Subsubsección A.2.1.2).

Para este trabajo se modificaron las PM con Fc-COOH (PM-Fc) y, con el objetivo de mejorar el sensado y la monitorización electroquímica de la superficie de las PM-Fc, se estudió como afectaban parámetros como el tamaño de las PM o el nivel de humedad del compuesto PM/NTC en la eficiencia del conexionado con NTC.

Estas medidas se hicieron utilizando los sensores de Pt fabricados en IK4-Ikerlan (Figura 4.2) y el potenciostato Autolab PGSTAT 128N. Para la detección de los picos de Fc y la caracterización de los sensores modificados con PM/NTC se utilizaron la CV, la DPV y la EIS. En la CV se realizó un barrido de $-0,2$ V a $0,35$ V vs Pt a una velocidad de barrido de 50 $mV s^{-1}$, tanto en PBS 10 mM como en ferrocianuro 5 mM . En la DPV se aplicó el potencial de excitación entre $-0,05$ V y $0,5$ V vs Pt, con una amplitud de 50 mV y un potencial escalón de 2 mV, en PBS 10 mM . Finalmente, se realizaron EIS en ferrocianuro 5 mM entre $0,1$ Hz y 1 kHz, aplicando un voltaje de excitación de 10 mV.



Figura 7.17.: Esquema en la que se representa (1) la modificación de las PM-Fc; (2) la captura del analito y los lavados; (3) el conexionado con NTC y la respuesta, en la que se ve como el analito sombrea los Fc generando una disminución de la señal electroquímica [241].

7.4.2. Optimización de los parámetros de ensayo

Efecto del tamaño de las PM

La modificación de las PM con Fc se hizo paralelamente en dos tipos de PM cubiertas de estreptavidina, M280 ($\phi = 2,8 \mu m$) y T1 ($\phi = 1 \mu m$), las cuales tienen parecidas propiedades y superficies químicas, pero diferentes tamaños. En ambos casos, se usó EDC/NHS para activar los grupos carboxilo del Fc-COOH y se conjugaron entonces las PM con distintas concentraciones (2 mM, 4 mM, 8 mM y 16 mM) de los Fc-COOH activados, como se ha detallado en la Subsección 4.3.2. A continuación, se mezclaron estas PM-Fc con los NTC y mediante el atrapamiento magnético del compuesto PM/NTC, se confinaron sobre la superficie del electrodo de trabajo para su posterior medida electroquímica por CV o DPV en PBS 10 mM.

Como se observa en la Figura 7.18.a, cuando se realiza una CV, los NTC producen un codo a -0,2 V vs Pt que ya había sido observado por otros autores [149, 170] y que, como se ha comentado en la Sección 4.3, se atribuye a los defectos oxigenados presentes en los extremos de los NTC tratados con ácido. En la Figura 7.18.a también se ven los picos de oxidación y reducción producidos por el Fc a 0,1-0,2 V vs Pt, los cuales no se ven en las PM que no han sido modificadas con Fc. Como es de esperar, la altura de los picos de oxidación y reducción es proporcional a la cantidad de Fc-COOH que se ha utilizado en la conjugación de las PM (Tabla 7.2). Es más, los picos de Fc obtenidos mediante conexionado con NTC son en todos los casos mayores que los que se registran por detección directa (sin NTC) del mismo tipo de PM-Fc. La Figura 7.18.b muestra como ejemplo la detección por DPV de PM T1, conjugadas en presencia de 16 mM de Fc-COOH, realizada en paralelo sin o con conexionado de NTC. Así, mientras en el primer caso el pico de las PM-Fc₁₆ es de 0,83 μA , por conexionado con NTC las mismas PM-Fc₁₆ generan un pico de 21,68 μA . Por lo tanto, en este caso, el pico registrado utilizando los NTC es 26 veces mayor. Esto se atribuye a que, mientras por detección directa de las PM-Fc solo se detectan los Fc que están cerca de la superficie del electrodo, mediante el conexionado de las PM con la superficie del electrodo usando NTC se detectan también los Fc que no están en contacto directo con la superficie del electrodo. Por consiguiente, se puede decir que el conexionado con los NTC permite pasar de un sensado en 2D (superficie del electrodo) a un sensado en 3D (superficie de las PM).

Cuando se comparan el sensado de las PM M280 y T1, para las primeras se obtiene un rango lineal más amplio respecto de la concentración de Fc incorporado a la superficie (Figura 7.19). Sin embargo, la reproducibilidad de las medidas es mejor para las T1, que son las PM más pequeñas ($\phi = 1 \mu m$; Tabla 7.2). Tanto las PM M280 como las T1 se utilizan a concentraciones de 5 mg mL⁻¹ lo que, según las descripciones del proveedor, equivale a 3 – 3 5 10⁸ PM y 3 5 – 5 10⁹ PM por mL para las M280 y las T1, respectivamente. Por lo tanto, volúmenes similares equivalen a 10 veces más PM cuando se utilizan las T1, pero áreas totales del mismo orden de magnitud en los dos casos. En trabajos anteriores también se habían observado estas

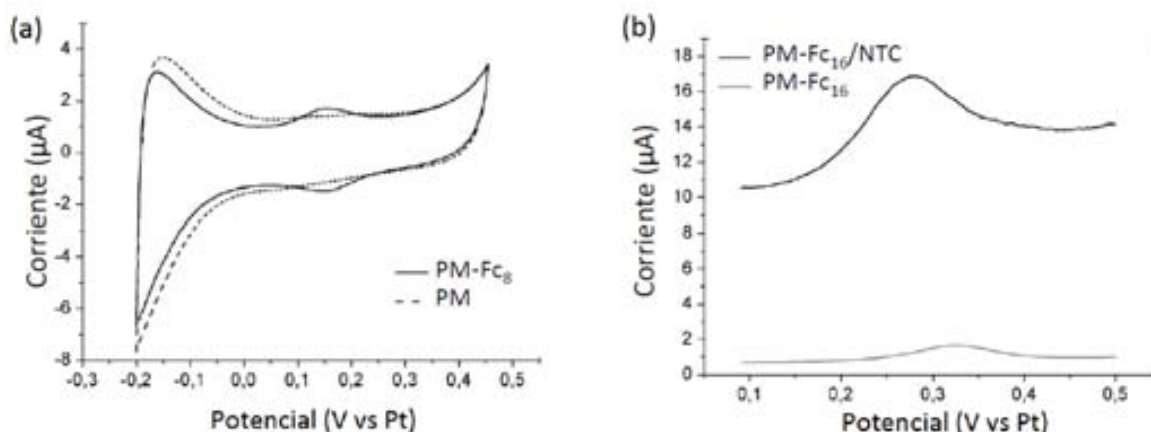


Figura 7.18.: (a) CVs registradas en PBS tras la modificación del WE del sensor con PM/NTC, usando PM conjugadas o no con 8 mM de Fc-COOH. (b) DPVs realizadas tras el conexionado de las PM-Fc₁₆ con NTC y sin conexionado.

diferencias en el comportamiento de PM de distinto tamaño [149] y se ha sugerido que, mientras las PM de mayor tamaño pueden atrapar más tubos por partícula, las PM más pequeñas producen un empaquetamiento más denso de los NTC durante el atrapamiento magnético del compuesto PM/NTC. En nuestro caso, los resultados sugieren que la utilización de PM más pequeñas produce un recubrimiento más homogéneo de los NTC en la superficie de las PM y/o una mejora en el conexionado, lo que conlleva una mayor reproducibilidad del sensado de la superficie. Por lo tanto, considerando esta observación y analizando los resultados de la Tabla 7.2, se decidió utilizar las PM T1 modificadas con 16 mM de Fc-COOH para las siguientes medidas.

	M 280		T1	
Fc-COOH (mM)	I _{Pox} (µA)	Desviación	I _{Pox} (µA)	Desviación
16	0,62	0,16	0,55	0,02
8	0,33	0,10	0,49	0,02
4	0,22	0,03	0,08	0,04
2	0,13	0,05	0,10	0,03

Tabla 7.2.: Picos registrados y las desviaciones en las medidas de la Figura 7.19.

Efecto del nivel de humedad/sequedad del compuesto PM-Fc/NTC en el sensado electroquímico

Se observó que, al dejar secar el compuesto PM-Fc/NTC sobre la superficie del electrodo, la altura de los picos del Fc generados por DPV aumentaba (Figura 7.20.a). Con el objetivo de analizar este efecto más detalladamente, las PM-Fc₁₆ se diluyeron en serie, manteniendo siempre la misma cantidad de PM en el ensayo mediante

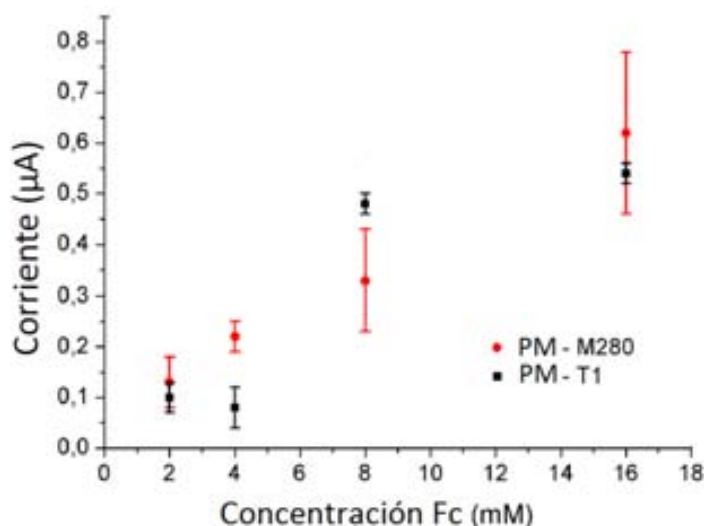


Figura 7.19.: Curva de calibración de los picos registrados tras la modificación de las PM M280 y T1 con distintas concentraciones de Fc y su detección voltamétrica mediante conexionado con NTC.

la adición de cantidades apropiadas de PM sin modificar. Después se añadieron los NTC a las PM/PM-Fc y se procedió al atrapamiento magnético del compuesto sobre la superficie del electrodo. La mitad de los compuestos PM/PM-Fc/NTC se analizaron inmediatamente, y la otra mitad se analizaron tras dejar secar el compuesto sobre la superficie del electrodo durante 20 minutos a temperatura ambiente. La detección electroquímica se hizo por DPV en PBS. Como se observa en la Figura 7.20, los picos obtenidos en el compuesto seco son mayores y más estrechos para todas las concentraciones de PM-Fc₁₆ analizadas. En estas condiciones, la detección de tan solo 0,5 μL de PM-Fc₁₆ es posible, y genera picos de altura similar a los obtenidos con 5 μL de PM-Fc₁₆ al estudiar el compuesto húmedo. Es más, cuando el compuesto PM/NTC está húmedo no se detectan concentraciones de PM-Fc₁₆ inferiores a 2,5 μL . Además, en general, la reproducibilidad de los picos mejora cuando el compuesto está seco.

Por otro lado, si se realiza una CV en 5 mM de ferrocianuro en vez de en PBS, los picos obtenidos en los compuestos húmedos son mayores que en los secos para todas las mezclas de PM/PM-Fc/NTC ensayadas (Figura 7.21.a y Tabla 7.3). Esto indica que la superficie activa es mayor en los compuesto húmedos. Sin embargo, la distancia entre los picos de oxidación y reducción es menor para los compuestos secos, indicando una cinética de transferencia de electrones más rápida y eficiente. Por lo tanto, mientras que la incorporación de los compuestos húmedos de PM/NTC aumenta la superficie activa del electrodo significativamente respecto de los sensores de Pt sin modificar, los sensores modificados con compuestos secos muestran una superficie solo un poco mayor que los sensores sin modificar, pero tienen un comportamiento electroquímico mejor.

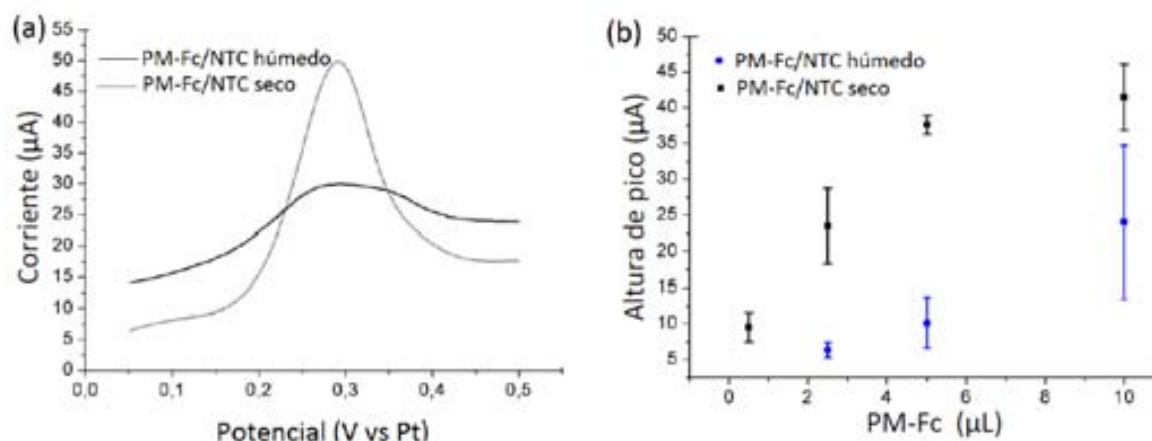


Figura 7.20.: (a) DPV que muestra el comportamiento electroquímico del compuesto cuando está seco y húmedo. (b) Grafica de calibración de distintas cantidades de PM-Fc (0,5 μL , 2,5 μL , 5 μL y 10 μL de PM-Fc₁₆) para el compuesto húmedo y seco.

CV (ferrocinauro 5 mM)	I_{Pox} (μA)	I_{Pred} (μA)	ΔE (mV)
Sensor Pt	6,95	-5,73	70
PM/NTC seco	9,81	-8,54	60
PM/NTC húmedo	28,59	-26,59	186

Tabla 7.3.: Valores de altura de pico registrados en las CVs de la Figura 7.21.a.

Para entender mejor este punto, los electrodos se caracterizaron adicionalmente por EIS en ferrocianuro 5 mM, antes y después de la modificación con PM o con PM/NTC (Figura 7.21.b y Tabla 7.4). En estas medidas, del mismo modo que en la Sección 7.2, se calcularon los parámetros R_s y R_{ct} haciendo un ajuste de los resultados de la EIS usando el circuito equivalente de Randles que se muestra en la Figura 7.5. Como la R_s depende básicamente de la concentración iónica, del tipo de iones presentes en la solución y de la geometría del sensor, los cuales se mantienen constantes en todas las medidas, el valor de la R_s es de 100 Ω en todos los casos.

La R_{ct} es inversamente proporcional a la velocidad de transferencia de carga heterogénea y afecta a la sensibilidad y al tiempo de respuesta del sensor. Por lo tanto, cuanto menor es la R_{ct} más rápida será la transferencia de electrones. En la Tabla 7.4 se resumen los valores obtenidos para el sensor de Pt, el sensor de Pt modificado con PM y el sensor de Pt modificado con el compuesto de PM/NTC, tanto seco como húmedo. De promedio, los electrodos sin modificar presentan valores de R_{ct} de alrededor de 1,4 k Ω . Cuando se modifica el sensor con PM (sin NTC) la R_{ct} aumenta a 12 k Ω , lo que implica un cierto nivel de pasivación del electrodo. Sin embargo, cuando el sensor se modifica con PM/NTC los valores de la R_{ct} disminuyen debido a las propiedades conductoras de los NTC. El distinto comportamiento del compuesto de PM/NTC cuando está seco o húmedo, también es evidente en la EIS. El valor

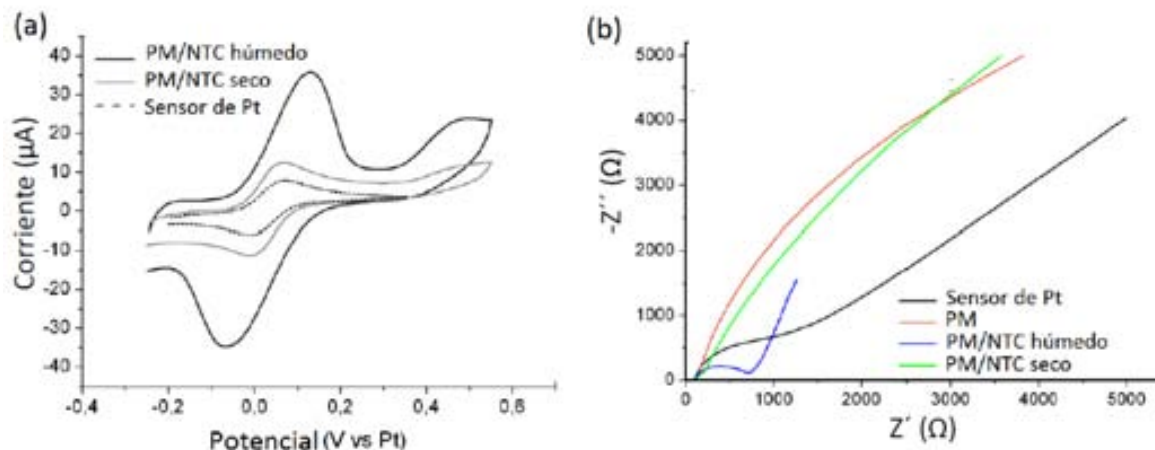


Figura 7.21.: (a) CVs registrados en ferrocianuro 5 *mM* en un electrodo de Pt sin modificar, modificado con PM/NTC, o modificado con PM/NTC y secado 20 min a temperatura ambiente. (b) EIS registradas en ferrocianuro 5 *mM* en un electrodo de Pt sin modificar, o el mismo electrodo modificado con PM, con PM/NTC (sedimento húmedo), o con PM/NTC sometido a secado.

promedio de la R_{ct} de los compuestos secos es menor que el de los compuestos húmedos (0,3 *k* vs 0,69 *k*), lo que es consistente con los resultados obtenidos en las CV en ferrocianuro.

EIS (ferrocianuro 5 <i>mM</i>)	R_{ct} (<i>k</i> Ω)	Desviación
Sensor Pt	1,38	0,09
PM	12,05	3,31
PM/NTC seco	0,30	0,18
PM/NTC húmedo	0,69	0,22

Tabla 7.4.: Valores de R_{ct} registrados en las EIS de la Figura 7.21.b.

Las diferencias en el comportamiento del compuesto PM/NTC dependiendo del nivel de humedad podrían indicar que el compuesto húmedo está formado por unas multicapas relativamente dispersas y que el PM/NTC seco conforma una estructura más compacta, lo cual estaría en concordancia con la literatura [252]. En el primer caso, habrá espacio libre entre las capas de NTC, que se comportarán como una capa semi-porosa a través de la que se difundirá el electrolito. Por lo tanto, habrá más NTC expuestos al electrolito y se formará una capa de difusión más extensa. Esto implica un área efectiva mayor, pero también menor probabilidad de contacto eléctrico entre los NTC, las PM y el electrodo. Por consiguiente, los compuestos húmedos generan picos más altos cuando las especies electroactivas están en solución, pero la velocidad de transferencia de carga y la eficiencia de conexionado con las PM son peores que en los compuestos secos. En el caso del compuesto seco, la for-

mación de una estructura compacta con capas de NTC empaquetadas genera capas de difusión superpuestas [252]. Por consiguiente, estos electrodos generan corrientes solo un poco mayores que los electrodos sin modificar, pero su comportamiento electroquímico es mejor. En este caso, la superficie de las PM está mejor conectada al electrodo, lo que conlleva un mejor sensado de la superficie de la PM, generando picos del Fc superficial más altos.

7.4.3. Detección de detergentes

Una vez se había estudiado el comportamiento electroquímico de los compuestos PM-Fc/NTC, y con el objetivo de comprobar si el conexionado de los NTC con las PM-Fc se podía utilizar para la detección rápida y sencilla de analitos no electroactivos, se hizo una prueba con la detección de detergentes. En concreto, se ensayó la detección de Tween 20, que es un detergente no iónico, ampliamente utilizado como emulsionante en el procesado de alimentos, para prevenir la adsorción inespecífica en el desarrollo de bioensayos, como estabilizante de proteínas y para mejorar la solubilización de las membranas [253]. Se sabe que el Tween 20, como otros surfactantes, se une inespecíficamente a una gran variedad de superficies y materiales [254, 255]. Según Garidel et al. [256], las partículas de detergente se unen directamente a las áreas superficiales hidrofóbicas de las proteínas, disminuyendo la interacción y agregación entre ellas. De acuerdo con esto, se propuso estudiar si la incubación de las PM-Fc en presencia de Tween producía la adsorción inespecífica del mismo sobre la superficie de las PM-Fc, y si esto afectaba a la detección electroquímica de las PM-Fc de alguna forma. Para ello se realizaron en paralelo medidas voltamétricas y de espectroscopía de impedancia.

Medidas voltamétricas

La detección de detergente con el método descrito en esta sección se sustenta en dos efectos: uno, en que la adsorción inespecífica del detergente a la superficie de las PM-Fc genera un enmascaramiento físico de una proporción de los marcadores (Fc) y, el segundo, en que la adsorción inespecífica del detergente afecta al conexionado de las PM-Fc con los NTC. Es decir, los NTC se adsorben menos eficientemente sobre PM que han sido anteriormente recubiertas con detergente.

Las medidas de detección de detergente se realizaron en compuestos húmedos de PM/NTC. El procedimiento seguido en las medidas fue el siguiente. Primero se mezclaron 5 μL de PM-Fc₁₆ y 5 μL de PM y, tras los correspondientes lavados (Subsección 4.3.2), se incubaron durante 2 minutos con 50 μL de PBS 10 $m\text{M}$ con distintas cantidades de Tween. Después de hacer 2 lavados en PBS, se añadieron los NTC y 30 $m\text{M}$ de PBS a las PM/PM-Fc y el compuesto de PM/PM-Fc/NTC resultante se confinó magnéticamente sobre el sensor. Finalmente, se realizó la DPV en PBS 10 $m\text{M}$ y se midió la altura de pico de Fc obtenida en la misma. Como se

muestra en la Figura 7.22, la incubación con Tween da lugar a una disminución en el pico de Fc, que es mayor cuanto mayor es la cantidad de Tween en la muestra. Este resultado sugiere que el Tween, al adsorberse sobre las PM, "sombrea" o recubre una parte de las moléculas de Fc presentes en la superficie de estas. Aparte de este efecto, como se observa en la Figura 7.22.a, la presencia de surfactantes genera al mismo tiempo una disminución de la corriente de fondo en la DPV. Se ha sugerido anteriormente que la corriente de fondo registrada en este tipo de electrodos nanoestructurados por atrapamiento magnético de NTC es proporcional a la eficiencia de conexionado de los NTC con las PM y con la superficie del electrodo [146, 147]. Por lo tanto nuestros resultados indican también que la presencia del detergente en la superficie de las PM empeora el conexionado de los NTC.

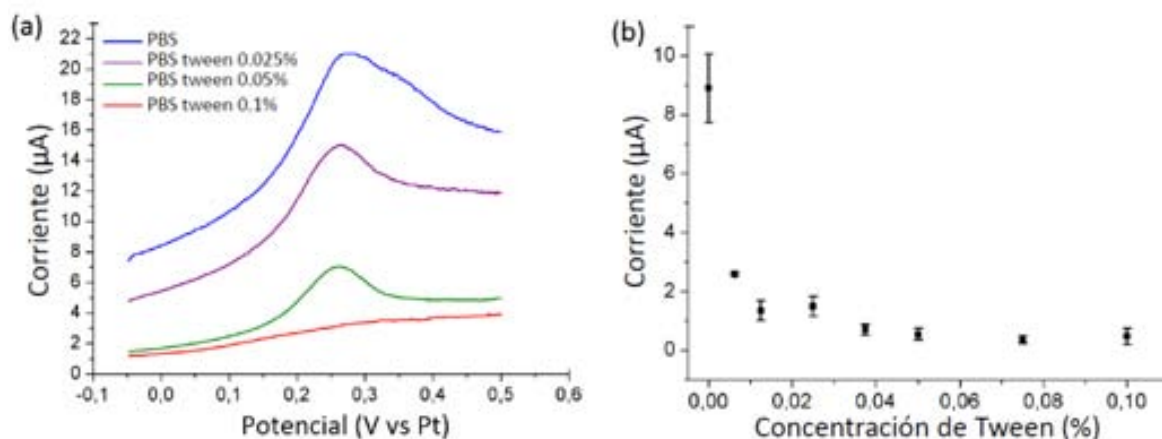


Figura 7.22.: Detección voltamétrica de detergentes. (a) Medidas de DPV realizadas en compuestos húmedos de PM-Fc/NTC tras incubar las PM-Fc en presencia de concentraciones crecientes de Tween. La adsorción inespecífica del detergente sobre la superficie de las PM-Fc recubre parcialmente las moléculas de Fc e interfiere en el atrapamiento de los NTC. Esto resulta en la disminución de la altura de pico generada por el Fc y de la corriente de fondo de la DPV. (b) Curva de calibrado de la altura del pico medido en la DPV para distintas concentraciones de Tween.

Medidas de espectroscopía de impedancia

De igual modo, se llevó a cabo la detección de detergentes mediante EIS en ferrocianuro 5 mM (Figura 7.23). Los valores R_s y R_{ct} se calcularon usando para el ajuste el circuito equivalente de Randles de la Figura 7.5.

En este caso, se observó que cuando las PM/PM-Fc se incubaban en presencia de Tween, la R_{ct} aumentaba de forma proporcional a la concentración de Tween (Figura 7.23). Esto indicaba que la eficiencia de transferencia de carga empeoraba, lo cual sugería que el conexionado con NTC también lo hacía. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en las medidas voltamétricas y demuestran

que la unión de un analito, en este caso Tween, a las PM-Fc se puede monitorizar electroquímicamente mediante el conexionado de los NTC.

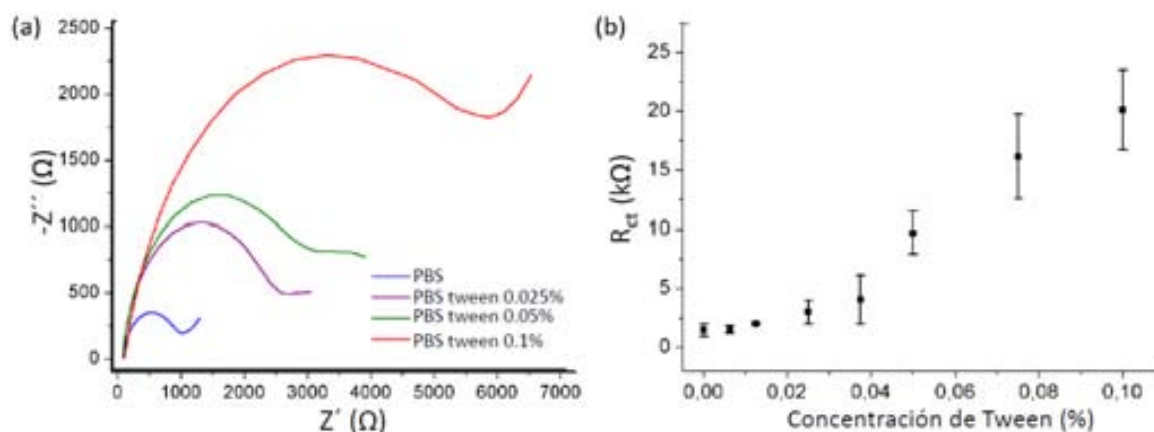


Figura 7.23.: Detección impedimétrica de detergentes. (a) Medidas EIS realizadas en ferrocianuro 5 mM usando un electrodo de Pt modificado con compuestos húmedos de PM-Fc/NTC, formados tras incubar las PM-Fc con distintas concentraciones de Tween. La incubación de las PM-Fc en presencia del detergente resulta en el incremento de la resistencia a la transferencia de carga, sugiriendo que el conexionado con NTC empeora. (b) R_{ct} s medidas en las curvas EIS tras las incubación de las PM-Fc en presencia de concentraciones crecientes de Tween.

7.4.4. Detección de proteínas

En este apartado se evalúa si el sombreado de la superficie de las PM-Fc que se había explotado para la detección de detergentes (Subsección 7.4.3), el cual ocurre de manera aleatoria, se podría aplicar también a la detección de proteínas por afinidad usando PM modificadas con bioreceptores específicos contra ellas. En estas medidas se utilizó la interacción estreptavidina-biotina como modelo y las medidas se realizaron tras dejar secar el compuesto de PM/NTC. La interacción estreptavidina-biotina se ha analizado varias veces en la literatura [257, 258, 259] y, según Yuan et al. [260], es la interacción no covalente más fuerte conocida en la naturaleza, estabilizada gracias a la creación de una extensa red de puentes de hidrógeno.

Para el sensado de proteínas, también se usaron las PM-Fc₁₆ que, como se ha explicado anteriormente, eran PM de 1 μm de diámetro recubiertas de estreptavidina, que habían sido conjugadas con Fc-COOH. Para estos experimentos, las PM-Fc₁₆ se incubaron durante 15 minutos en presencia de concentraciones crecientes (0-16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de un anticuerpo biotinilado, preparado en PBS suplementado con 0.1 % BSA. La inclusión de BSA pretendía limitar la adsorción inespecífica y trabajar con una matriz de muestra algo más compleja que el PBS y más cercana a las muestras reales. Tras la incubación, las PM se lavaron una vez en PBS tween 0.05 % y dos veces en PBS. A continuación, se añadieron los NTC y el PBS 3 veces concentrado

a las PM-Fc, los complejos de PM-Fc/NTC se confinaron con la ayuda de un imán sobre la superficie de un sensor de Pt y el compuesto se dejó secar. El resultado que se esperaba era que los anticuerpos biotinilados, que se capturaban rápidamente sobre las PM-Fc cubiertas de estreptavidina, produjeran un sombreado de los Fc que se encontraban en los lugares de unión de las biotinas o cerca de estas. Sin embargo, solo las concentraciones muy altas de anticuerpo generaban un sombreado de los Fc significativo como para diferenciarlo de la corriente de fondo. Este efecto se atribuyó a que los Fc se conjugan aleatoriamente a toda la superficie de las PM, generando corrientes de fondo muy altas. Por lo tanto, solo una pequeña proporción de Fc era enmascarada o ensombrecida por los anticuerpos, lo que no generaba una disminución de la señal apreciable.

Por este motivo, empezó por estudiarse el efecto de la cantidad de PM-Fc₁₆ empleada en las incubaciones con anticuerpo biotinilado y posteriores medidas. Inicialmente, se disminuyó la cantidad de PM-Fc₁₆ en las incubaciones. Sin embargo esto generaba una gran variabilidad entre muestras, lo que se atribuyó a que al manipular cantidades menores de PM-Fc se perdían más PM durante las incubaciones y los lavados y, después, el conexionado con los NTC era menos eficiente. Por esto, se optó por mantener constante en todo momento la cantidad de PM, añadiendo PM sin modificar a medida que se disminuía la cantidad de PM-Fc₁₆ en los experimentos. Las diferentes proporciones de PM/PM-Fc₁₆ se incubaron entonces con diferentes concentraciones de anticuerpo biotinilado, preparado en PBS BSA 0.1 %, se realizaron los lavados correspondientes y se atraparon magnéticamente los compuestos de PM/NTC sobre la superficie del sensor de Pt. La detección electroquímica se llevó a cabo por DPV.

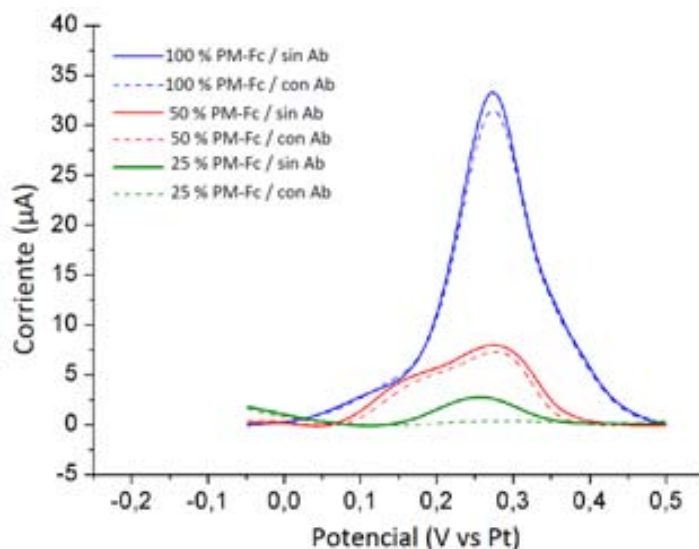


Figura 7.24.: DPVs realizadas para distintas proporciones de PM y PM-Fc₁₆, tras la incubación de las mismas con 1 mg mL^{-1} de BSA, con y sin $16 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo biotinilado (Ab). La unión de los anticuerpos produce un sombreado de los Fc, un efecto que es inversamente proporcional a la cantidad de PM-Fc en la mezcla.

Como se muestra en la Figura 7.24, en ausencia de anticuerpo el pico del Fc depende de la cantidad de PM-Fc₁₆ presente en la mezcla de PM/PM-Fc₁₆. Si solo se utilizaban las PM-Fc₁₆, el efecto del sombreado de Fc por los anticuerpos era limitado. Por ejemplo, incubaciones con $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ solo generaban disminuciones de $5 \mu\text{A}$, correspondientes a una disminución del 15% del pico en comparación con el pico obtenido en las incubaciones sin anticuerpo. Como se ha discutido anteriormente, esto se atribuyó a la alta corriente de fondo registrada. Sin embargo, a medida que se disminuía la proporción de PM-Fc₁₆ en la mezcla, el efecto del sombreado mejoraba proporcionalmente. Por ejemplo, incubaciones con $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo generaban disminuciones de la señal del 27% o del 90% para mezclas que contenían un 50% ($5 \mu\text{L PM-Fc}_{16} + 5 \mu\text{L PM}$) y un 25% ($2,5 \mu\text{L PM-Fc}_{16} + 7,5 \mu\text{L PM}$) de PM-Fc₁₆, respectivamente (Figura 7.24).

La Figura 7.25 muestra los resultados obtenidos tras incubar una mezcla de 25% de PM-Fc₁₆ y 75% de PM con 0, 2, 4, 8 y $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo biotinilado. Como se observa, la altura del pico de oxidación del Fc disminuye a medida que aumenta la cantidad de anticuerpo biotinilado presente en la muestra, generando mayores niveles de sombreado de Fc. El límite de detección, calculado con la fórmula de la Sección 4.6, es de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo, una concentración que genera disminuciones del pico de Fc del 50% respecto a los controles negativos. Este LOD tan alto se atribuye a la elevada corriente de fondo del ensayo. La principal causa de este efecto es presumiblemente el alto número de unidades de Fc que han sido incorporadas alejadas de los puntos de unión estreptavidina-biotina de las PM. Estas causan una variabilidad de la señal muy alta en los controles negativos y no pueden ser sombreadas por la unión del anticuerpo.

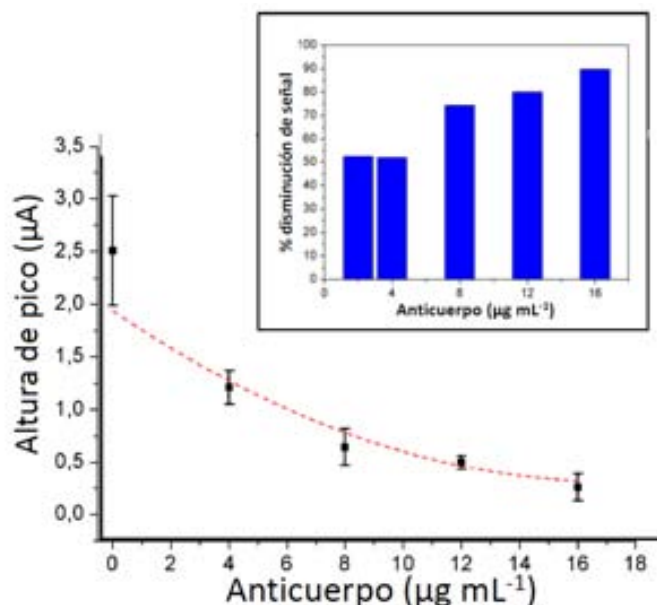


Figura 7.25.: Gráfica de calibración realizada con 25% PM-Fc para distintas concentraciones de anticuerpo.

7.4.5. Conclusiones

La detección directa de analitos no electroactivos se ha realizado utilizando un método distinto y novedoso. La modificación de PM con marcadores electroactivos, como el ferroceno, y su conexionado con NTC, ha proporcionado un método de detección de dianas no electroactivas que se ha demostrado para la detección de dos analitos distintos: Tween 20 y un anticuerpo biotinilado. La unión del detergente ocurre de manera aleatoria en toda la superficie de la PM y el anticuerpo es capturado por afinidad mediante la unión biotina-estreptavidina.

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que la mejora del comportamiento y de la sensibilidad de un ensayo de este tipo dependerá de la incorporación eficiente de marcadores electroactivos directamente a los ligandos de interés y no a toda la superficie de la PM, una posibilidad que no ha podido ser ensayada adicionalmente en el contexto de esta tesis. A pesar de ello, los resultados obtenidos demuestran que el conexionado con NTC de PM modificadas con marcadores electroquímicos podría ser explotado para la detección directa de dianas moleculares no electroactivas, en un formato de ensayo rápido y sencillo.

8. Nanoestructuración de electrodos de capa fina integrados en dispositivos micro uídicos

8.1. Introducción

En este capítulo se combinan las dos líneas de trabajo desarrolladas a lo largo de esta tesis. Por un lado, la nanoestructuración de la superficie del electrodo con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los ensayos (Capítulo 6 y Capítulo 7). Por otro lado, los pasos dados hacia la portabilidad del sistema de medida, mediante las medidas realizadas en un cartucho microfluídico con un potencióstato portable desarrollado en IK4-Ikerlan (Sección 4.4). Así, el objetivo de esta parte del trabajo es la optimización de un protocolo para nanoestructurar la superficie de sensores integrados en un cartucho microfluídico, para obtener una mejora en la sensibilidad de las medidas realizadas en este dispositivo (Figura 4.4). En la Sección 5.3 ya se ha descrito la transferencia de algunas medidas de detección electroquímica de ADN usando MB, realizadas inicialmente en el sensor de Au (Figura 5.3), al sensor del cartucho microfluídico. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo estas medidas aún no se había trabajado suficientemente en la nanoestructuración de la superficie de electrodos con PM/NTC para implementar esta modificación dentro de una cámara de flujo cerrada. Como ya se ha comentado anteriormente, el sensor del cartucho microfluídico tiene la misma geometría que el sensor de la cápsula de Au que se ha usado en secciones anteriores, pero en este caso el WE es de Pt (Tabla 4.4).

En los últimos años se han desarrollado muchos biosensores basados en la utilización de NTC, pero ha sido recientemente cuando se han empezado a integrar tales dispositivos con NTC en sistemas POC [261]. El objetivo principal de estos dispositivos es la detección precoz de enfermedades utilizando métodos de análisis no invasivos gracias a su alta sensibilidad, rápida respuesta y necesidad de un volumen de muestra reducido. En la literatura, se pueden encontrar algunos sensores con NTC integrados en cartuchos microfluídicos [262, 263, 264]. Por ejemplo, la integración de los NTC en los dispositivos microfluídicos en el caso de Kim et al. [263] se realiza mediante nanolitografía, llevada a cabo con un haz de electrones “e-beam” y “lift-off” para formar “nanodots” de Ni en la superficie del dispositivo, sobre los que después crecer “in-situ” los NTC por PECVD (Subsección 3.2.2). En el caso de Yang et al. [264] y Wang et al. [265] la modificación con NTC se hace mediante la deposición y secado

de un volumen de una suspensión de NTC sobre zonas de sensado de dispositivos microfluídicos de papel. Todos estos procesos tienen el inconveniente de que los dispositivos microfluídicos no se pueden volver a utilizar; es decir, la modificación con NTC es irreversible. Además, en el caso de Kim et al. [263] el proceso de deposición de NTC resulta muy complicado y caro para poder implementarlo en un dispositivo LOC, siendo el bajo coste un requerimiento importante de estos dispositivos.

La mayoría de los dispositivos analíticos microfluídicos en los que se han integrado NTC son dispositivos de papel [264, 265, 263]. Sin embargo, en nuestro trabajo se utiliza un cartucho microfluídico de COP, que se ha descrito en la Subsección 4.2.3. La modificación del electrodo de trabajo de Pt del cartucho de COP (Figura 8.1) se consigue siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 4.3. Este proceso permite la modificación con NTC del electrodo de trabajo, de una manera simple, rápida y de bajo coste. Además, como se ha detallado en la Sección 4.3, la modificación es reversible. En este caso, y como se ha venido haciendo a lo largo de esta tesis, la modificación del electrodo se hace con la ayuda de un imán, mediante el conexionado de los NTC con las PM y el confinamiento magnético del compuesto PM/NTC sobre la superficie del electrodo de trabajo.

8.2. Optimización de las condiciones de trabajo

8.2.1. Pretratamiento, manipulación y nanoestructuración en el cartucho microfluídico

El procedimiento seguido para la nanoestructuración del sensor integrado en el cartucho es el mismo que se ha aplicado a lo largo de este trabajo y que se describió en la Sección 4.3. Se formaba un compuesto de PM/NTC en tubos eppendorf, se inyectaba en el cartucho y se confinaba magnéticamente sobre la superficie del WE con la ayuda de un imán (Figura 8.1). Para la detección electroquímica se utiliza el potencióstato portátil diseñado en IK4-Ikerlan, modificado para realizar las medidas en este cartucho (Figura 4.6.b). El potencióstato de la Figura 4.6.b tiene unos pines que permiten la conexión directa con los contactos (RE, WE, CE) del cartucho microfluídico (Figura 8.1.a). La manipulación de los fluidos, la modificación de la superficie del electrodo de trabajo del cartucho microfluídico y su regeneración y lavado se hicieron mediante la inyección controlada por una bomba peristáltica P720 (Instech), a través de los canales microfluídicos. La cámara de detección electroquímica, donde está el sensor, tiene una capacidad de $10 \mu L$.

A continuación se detallan el pretratamiento, la manipulación y el procedimiento seguidos para la nanoestructuración del sensor. Antes de empezar con la modificación del sensor con PM/NTC, se activaba su superficie electroquímicamente. Para ello se inyectaban a través del inlet (Figura 8.1.a), $20 \mu L$ de PBS $10 mM$ a un flujo de $89 \mu L \text{ min}^{-1}$ y, cuando se había llenado la cámara de detección electroquímica, se

apagaba la bomba. A continuación, se realizaba una cronoamperometría para activar el sensor de Pt con pulsos de 5 segundos a $-1,2\text{ V}$, 0 V y $1,2\text{ V}$ vs Pt. Para vaciar la cámara de PBS por el outlet de la Figura 8.1.a, se encendía de nuevo la bomba a un flujo de $89\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. Después se caracterizaba el electrodo de trabajo por CV en ferrocianuro $5\ \text{mM}$. Tras realizar la CV se encendía la bomba y se vaciaba el cartucho. Si el resultado de la CV generaba los picos de oxidación y reducción del ferrocianuro que se esperaban, se limpiaba la cámara y se procedía a la modificación del electrodo de trabajo; en caso contrario, se volvía a activar la superficie del sensor. Para limpiar la cámara se inyectaban $40\ \mu\text{L}$ de PBS $10\ \text{mM}$ a un flujo de $89\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ y se esperaba hasta que el cartucho se vaciase completamente.

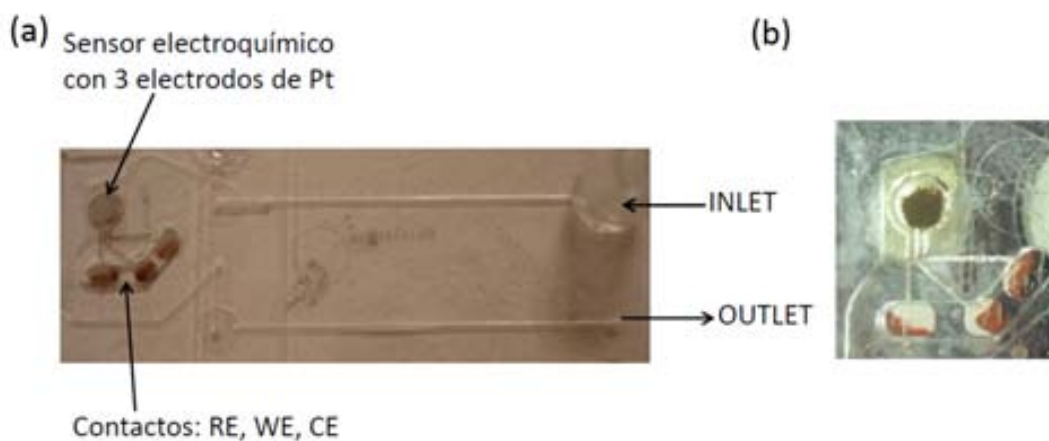


Figura 8.1.: (a) Cartucho microfluidico de COP con sensor de Pt, donde se ven los canales de inyección (Inlet) y salida (Outlet) de la muestra. (b) Superficie de WE nanoestructurada con PM/NTC, con la cámara electroquímica llena de ferrocianuro.

Una vez se había activado y limpiado el sensor, se procedía con su nanoestructuración. Para ello, se mezclaba el compuesto PM/NTC en tubos eppendorf en las proporciones que se optimizarán en la Subsección 8.2.2. Para asegurarnos de que todo el compuesto PM/NTC se concentraba en la superficie del electrodo de trabajo de manera homogénea, se colocaba un imán de neodimio (Supermagnete) de $5\ \text{mm}$ de diámetro encima de la cámara del sensor y se inyectaba el compuesto PM/NTC. Cuando las PM/NTC se encontraban dentro de la cámara, pero confinadas en la pared superior de la misma, se retiraba este primer imán de la parte superior de la cámara de detección y se colocaba un segundo imán de neodimio de $1\ \text{mm}$ de diámetro debajo del WE. De esta manera, todo el compuesto que se encontraba en la cámara de detección se concentraba encima de la superficie de Pt del WE (Figura 8.1.b). A continuación, se inyectaban $20\ \mu\text{L}$ de la solución que queríamos medir a un flujo de $40\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. Esta vez se utilizaba una velocidad de flujo más lenta, para que el compuesto de PM/NTC no se moviera de la superficie del WE. Una vez se había llenado la cámara con la solución, se apagaba la bomba y se realizaba la medida electroquímica.

Acabada la medida, se retiraba el imán colocado debajo del cartucho, con la bomba peristáltica se vaciaba el cartucho y se limpiaba 3 veces inyectando $40 \mu\text{L}$ de PBS 10 mM a $89 \mu\text{L min}^{-1}$. De este modo, el cartucho quedaba listo para su reutilización. En la Figura 8.2 se pueden ver dos CVs obtenidas en ferrocianuro 5 mM usando un cartucho nuevo recién activado y en el mismo cartucho tras realizar la modificación con NTC y su posterior limpieza. Al contrario de los métodos de modificación que se encuentran en la literatura, el método presentado en esta tesis permite reutilizar el cartucho después de su nanoestructuración.

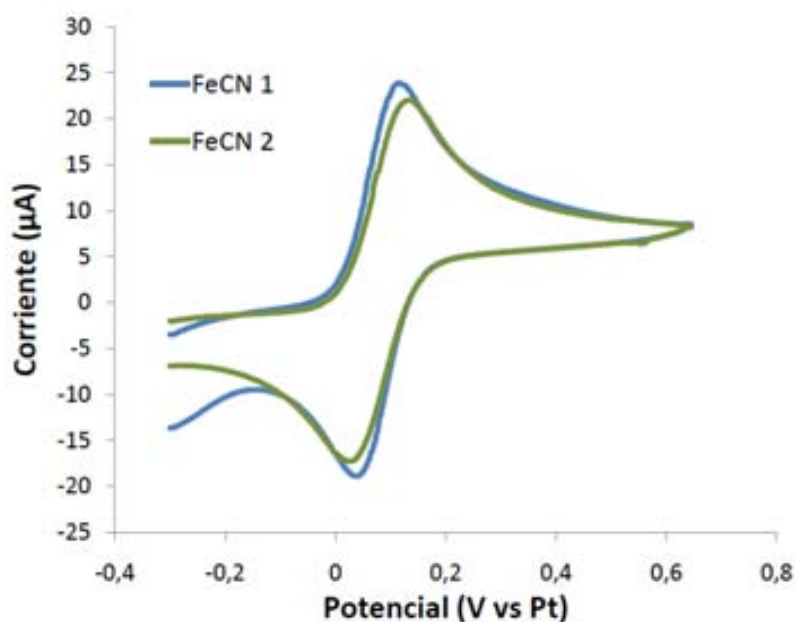


Figura 8.2.: CVs en ferrocianuro 5 mM obtenidos usando el cartucho microfluídico antes de modificar el sensor con PM/NTC (FeCN 1) y después de modificar el sensor con PM/NTC y habiendo realizado los lavados para su reutilización (FeCN 2).

8.2.2. Optimización de las cantidades de PM y NTC

El primer paso para la optimización de las cantidades de PM/NTC es la limpieza y activación del sensor siguiendo el protocolo especificado en la Subsección 8.2.1. Para optimizar la cantidad de PM y NTC necesaria para la modificación de los sensores microfluídicos, se realizaron combinaciones de varias cantidades de PM y NTC y se estudió por CV en ferrocianuro 5 mM qué cantidades de PM y NTC generaban el mayor aumento del pico de oxidación del ferrocianuro.

Para cada cantidad de PM ensayada ($2, 4, 6$ y $8 \mu\text{L}$ de PM, 5 mg mL^{-1}) se hizo el conexionado con diversas cantidades de NTC ($0, 1, 2, 3, 4$ y $5 \mu\text{L}$ de NTC, 1 mg mL^{-1}). En general, para cada cantidad de PM ensayada, la altura de pico registrada aumenta proporcionalmente a la cantidad de NTC usada para el conexionado hasta

un cierto valor, a partir del cual la tendencia se invierte (Figura 8.3). Como se observa en la Figura 8.3.a, 2 μL de PM no son suficientes para atrapar los NTC ni cubrir la superficie del sensor y no se consigue una modificación reproducible del electrodo de trabajo. Cuando se aumenta la cantidad de PM hasta 8 μL , la cantidad de PM es tan grande que el compuesto de PM/NTC se queda excesivamente pegado al WE por la gran atracción magnética producida entre el imán y las PM, dificultando la reutilización del cartucho.

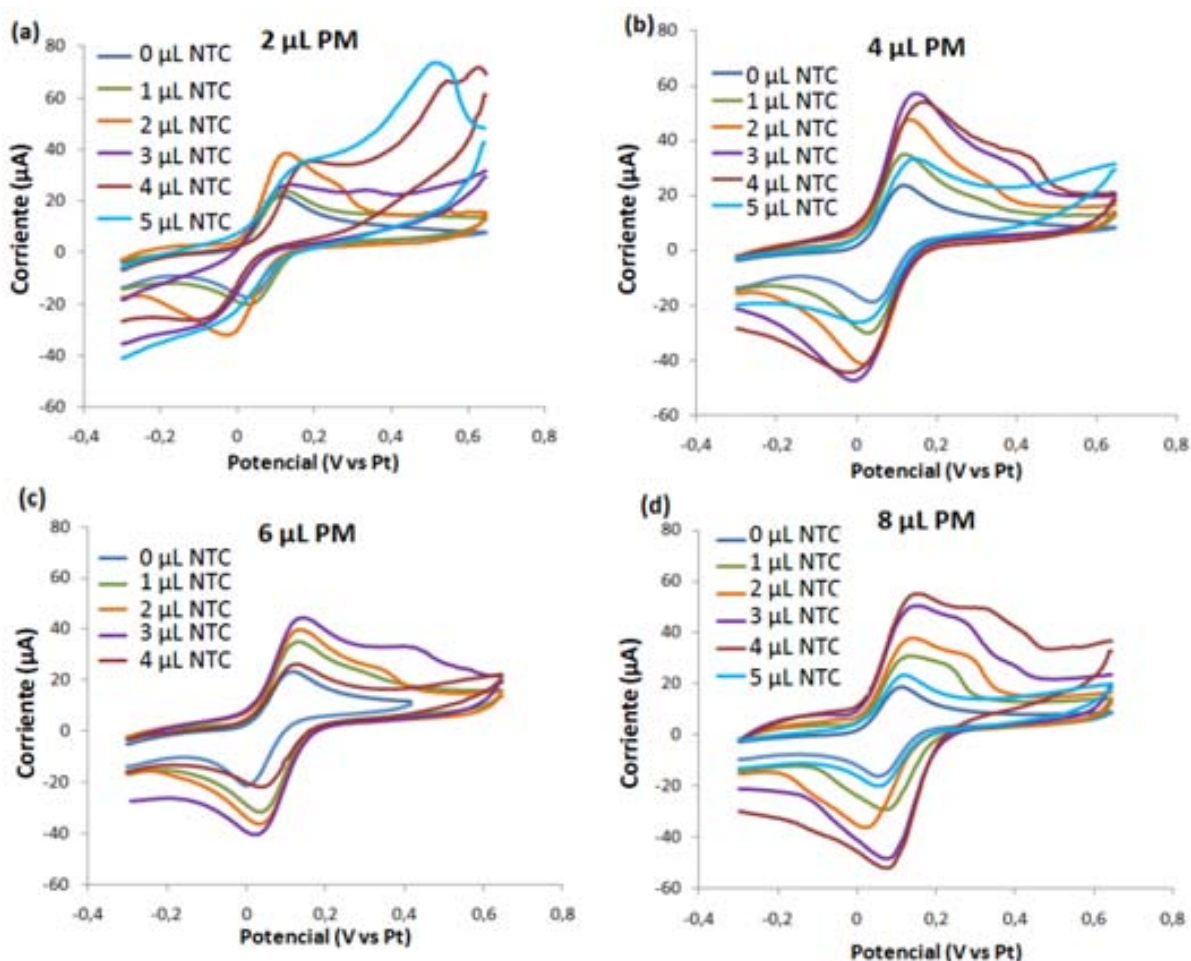


Figura 8.3.: CVs obtenidas en ferrocianuro 5 mM usando un cartucho micro údico en que el electrodo de trabajo ha sido modificado con distintas cantidades de NTC (0, 1, 2, 3, 4 y 5 μL de NTC, 1 mg mL^{-1}) y (a) 2 μL (b) 4 μL (c) 6 μL ó (d) 8 μL de PM (5 mg mL^{-1}).

Como se ve en la Figura 8.3 y Figura 8.4, donde se analiza también la reproducibilidad de las medidas, los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan 4 μL de PM con 2 ó 3 μL de NTC.

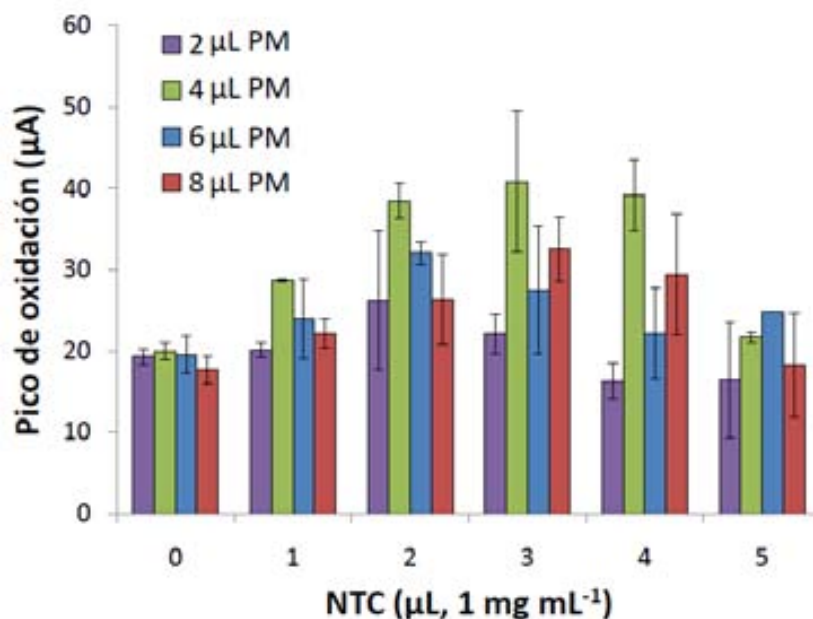


Figura 8.4.: Alturas del pico de oxidación en ferrocianuro 5 mM medidas por CV en el cartucho micro uídico modificado con diferentes cantidades de PM/NTC.

8.3. Aplicación a la detección de ácido úrico (AU) en solución

Después de optimizar la nanoestructuración del sensor integrado en el cartucho, se hicieron unas medidas preliminares de detección de AU. Como ya se ha comentado en la Sección 7.3, donde se ha realizado la detección del AU en electrodos de capa fina, el AU es un analito de interés clínico. En este caso también se realiza *la nanoestructuración con NTC para la producción reversible de electrodos mejorados*.

De este modo, siguiendo la preparación de las soluciones con distintas concentraciones de AU descrita en la Sección 7.3, se hicieron medidas en el cartucho microfluídico con el electrodo modificado y sin modificar con NTC. Para la nanoestructuración de la superficie del WE y la medida del AU se siguió el protocolo descrito en la Subsección 8.2.2. Por lo tanto, para la modificación de la superficie se utilizaron 4 μL de PM y 2 ó 3 μL de NTC, ya que no quedaba claro en la Figura 8.4 qué cantidad de NTC era la óptima para nanoestructurar la superficie del sensor. La Figura 8.5 resume los picos de oxidación obtenidos para distintas concentraciones de AU y en las distintas condiciones de medida ensayadas (cartucho modificado con/sin NTC mediante atrapamiento magnético de 2 ó 3 μL de NTC usando 4 μL de PM). De los resultados mostrados en la gráfica se puede concluir que, en el caso de las medidas de AU, la modificación del WE con 3 μL de NTC y 4 μL de PM genera los mejores resultados, sobre todo cuando se analizan concentraciones altas de AU (200-100 μM

AU). En la Figura 8.6 se muestran algunos ejemplos de las CVs obtenidas para distintas concentraciones de AU medidas en el cartucho modificado con 3 μL de NTC y sin modificar con NTC.

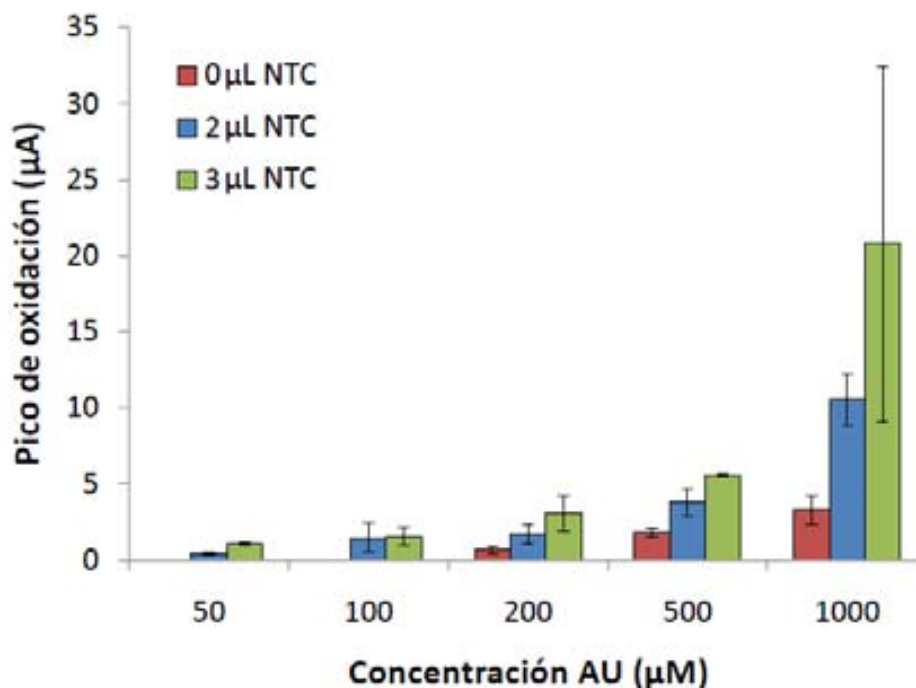


Figura 8.5.: Picos de oxidación obtenidos para distintas concentraciones de AU medidas por CV usando el cartucho micro uídico modificado con 0, 2 y 3 μL de NTC (1 mg mL^{-1}).

En las medidas preliminares que se han hecho en el cartucho (Figura 8.5), se observa como la sensibilidad del sistema es menor al medir en el cartucho que en las medidas realizadas anteriormente usando un sensor externo (cápsula Au; Sección 7.3). Hay varios factores que podrían explicar esta bajada en la sensibilidad, entre las cuales destaca que la modificación de la superficie del WE mediante la inyección de las PM/NTC por los canales microfluídicos no es tan reproducible como el pipeteo directo de los mismos sobre la superficie del electrodo. Además, en algunos casos durante la inyección de la muestra se generan burbujas de aire en la cámara de detección, lo cual afecta al flujo y a la posterior detección electroquímica. Por otro lado, el cartucho está producido en un substrato distinto (COP), lo cual podría tener algún efecto en la adhesión de los complejos de PM/NTC a la superficie del sensor y/o podría generar una disminución en la sensibilidad de detección del AU, algo que no se ha estudiado en profundidad. En cambio, sí se ha observado que los sensores sin PM/NTC integrados en el cartucho de COP también generan una menor sensibilidad para la detección del AU. Por ejemplo, en las medidas llevadas a cabo en la cápsula Au (sin modificar con NTC), se detectaba AU a partir de

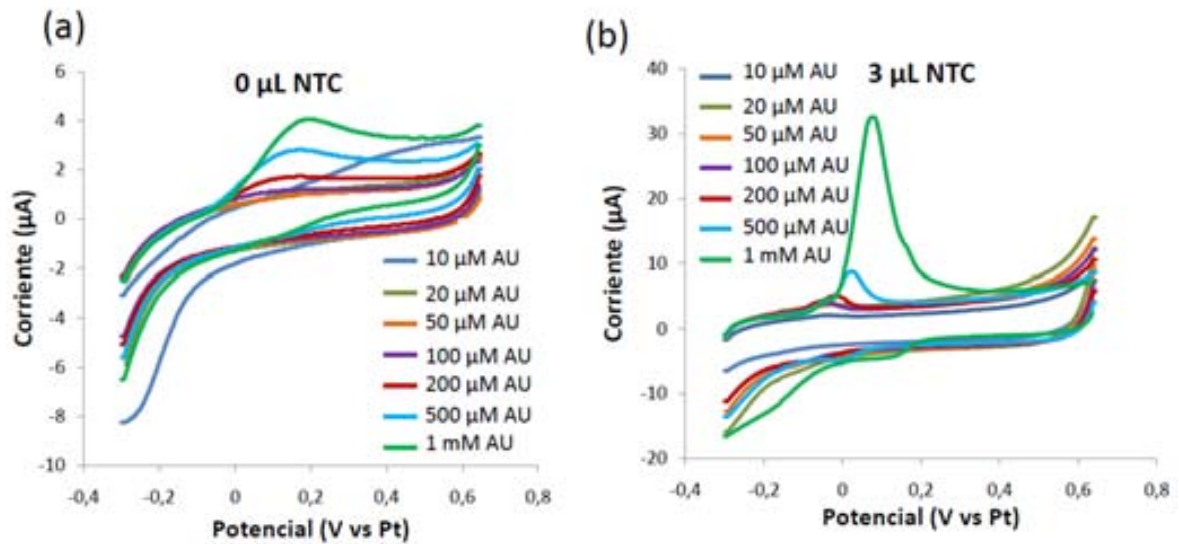


Figura 8.6.: CVs de distintas concentraciones de AU realizadas en el cartucho micro uídico con el sensor (a) sin modificar o (b) modificado con 3 μL de NTC.

una concentración de 100 μM (Sección 7.3). Por el contrario en las medidas que se han hecho en el cartucho no se detectaba la oxidación del AU a concentraciones inferiores a 200 μM . A pesar de esto, la nanoestructuración del electrodo del cartucho microfluídico logró la generación de picos un 300-600 % más altos en las CVs para las concentraciones de AU ensayadas. Es más, los cartuchos modificados detectaron concentraciones de AU de hasta 50 μM , cuando el sensor no modificado no generaba picos para concentraciones más bajas que 200 μM de AU.

8.4. Conclusiones

Los resultados que se presentan en este capítulo muestran que es posible integrar el protocolo de nanoestructuración y realizar medidas electroquímicas, por ejemplo del AU, en el cartucho microfluídico. Sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos a los que se obtenían en la Sección 7.3, hay que mejorar muchos aspectos para conseguir las sensibilidades que se consiguen en un sensor externo: manipulación de los fluidos dentro del cartucho, análisis de los sensores fabricados en COP, nanoestructuración de sensores en COP, etc. Otro paso necesario para la eventual automatización del proceso de producción de dispositivos microfluídicos nanoestructurados sería el de la realización de las mezclas de PM y NTC dentro de una cámara del cartucho controlado por la bomba peristáltica, sin necesidad de ningún procesado manual. De este modo, como se ha comentado en la Sección 3.3, el grado de integración de la tecnología microfluídica puede variar de tener un cartucho microfluídico desechable que se controla por equipos externos (bombas, sistemas de detección, etc.), a disponer de todas las funciones necesarias para el procesado y el análisis de

muestra integrados. Así, en nuestro caso ya tenemos un sistema de detección integrado en el cartucho, pero no una bomba integrada que controle la manipulación y mezcla de los fluidos a través de los canales microfluídicos.

9. Conclusiones y futuras líneas de investigación

En este capítulo se presentan las conclusiones extraídas a la luz del trabajo realizado y los resultados obtenidos. Por último se proponen algunas ideas de trabajos futuros que darían continuidad y fortaleza a este trabajo de investigación.

9.1. Conclusiones

En el Capítulo 2 se han presentado los objetivos principales de esta tesis: el desarrollo de un sistema de detección electroquímica portable; y el desarrollo de un método simple, de bajo coste y rápido de nanoestructuración de la superficie de electrodos para la mejora de la sensibilidad en la detección electroquímica de distintos analitos. Esto se ha llevado a cabo mediante la aplicación del conexionado con NTC a diversos formatos biosensoriales para determinar en cuales aporta una ventaja significativa respecto al biosensado clásico sobre electrodos 2D. A continuación se presentan las conclusiones extraídas al llevar a cabo estos objetivos.

Desarrollo de un sistema de detección electroquímica portable

Esta parte del trabajo ha supuesto la continuación de una línea de investigación previa de IK4-Ikerlan, en el contexto de la cual se había desarrollado un dispositivo Lab on a Chip (LOC) que realizaba la amplificación selectiva de secuencias diana de ADN mediante PCR y su posterior detección óptica. Como parte de esta tesis, se ha modificado el equipo previamente desarrollado para producir en su lugar un sistema de detección electroquímica portable. De esta forma se ha conseguido simplificar y reducir el coste del dispositivo LOC, que incluye el potenciostato, un cartucho microfluídico con una celda electroquímica de 3 electrodos y un software de análisis de datos. Se ha comprobado que el LOC desarrollado genera resultados comparables a los de un potenciostato comercial. Las principales conclusiones extraídas de esta parte del trabajo se detallan a continuación:

- Para comprobar el funcionamiento del equipo desarrollado, se ha optimizado un ensayo de detección electroquímica de ADN libre en solución, utilizando un marcador electroquímico, el azul de metileno. El hecho de que la detección

se realice en solución, sin inmovilizar la hebra de ADN a la superficie del sensor, evita el tener que realizar previamente dicha inmovilización y permite la reutilización del electrodo.

- En estos experimentos las medidas electroquímicas se han realizado primeramente en un potenciostato comercial Autolab PGSTAT 128N y tras optimizar los ensayos electroquímicos, estos se han realizado en el potenciostato desarrollado en IK4-Ikerlan.
- La detección llevada a cabo en este último equipo permite obtener un LOD de $1,36 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN, que es suficientemente sensible para la aplicación propuesta, sobre todo teniendo en cuenta que el ADN que se va a detectar habrá sido previamente amplificado por PCR.
- También se han hecho unas medidas preliminares de detección electroquímica de ADN en el sensor integrado en un cartucho microfluídico, obteniéndose unos resultados satisfactorios.

Desarrollo de un método simple, de bajo coste y rápido de nanoestructuración de la superficie de electrodos

La nanoestructuración de las superficies de los sensores se ha llevado a cabo en tres tipos de electrodos: sensores serigrafiados (Capítulo 6), sensores de capa fina (Capítulo 7) y sensores integrados dentro del cartucho microfluídico (Capítulo 8). Este proceso ha consistido de dos partes principales:

- Optimización de la nanoestructuración de superficies en estos electrodos. Para ello se ha optimizado la cantidad de PM y NTC, el proceso de mezclado del compuesto PM/NTC, su deposición y se ha analizado la técnica de medida electroquímica más sensible para cada aplicación. Como hecho más relevante, se ha observado que el conexionado con NTC es mejor sobre electrodos serigrafiados de carbono, pero es más reversible sobre electrodos de capa fina de oro. No obstante, se ha demostrado que, una vez optimizada, la nanoestructuración con NTC mediante el conexionado de PM permite la modificación reversible de los 3 tipos de electrodos y su reutilización.
- Análisis del funcionamiento de estas superficies nanoestructuradas realizando ensayos de distinto tipo, cambiando tanto el procedimiento de captura del analito, como la técnica de medida electroquímica. Las superficies nanoestructuradas y ensayos realizados se han empleado para la detección de moléculas de interés diagnóstico, como la dopamina (DA), la mieloperoxidasa (MPO) y el ácido úrico (AU).

Nanoestructuración de electrodos serigrafiados

La nanoestructuración de electrodos serigrafiados se ha aplicado a la optimización de tres formatos de bioensayo, todos ellos basados en el sensado directo del analito sobre la superficie de las PM mediante el conexionado con NTC. Este método de detección se ha aplicado al biosensado directo de moléculas electroactivas y al biosensado de moléculas no electroactivas usando tanto marcadores enzimáticos como marcadores no enzimáticos. A continuación se detallan las conclusiones extraídas de cada formato de bioensayo:

- Detección de DA para demostrar el biosensado directo de moléculas electroactivas. El método propuesto en este trabajo se sostiene en la unión electrostática y concentración de la DA utilizando las PM recubiertas de estreptavidina, seguido de la detección electroquímica mediante el conexionado de los NTC a la superficie de las PM. Se ha comprobado que la captura y concentración de DA resulta muy rápida y eficiente si se usan PM modificadas con estreptavidina de origen comercial, sin ninguna modificación adicional. La detección electroquímica se ha llevado a cabo en sensores serigrafiados de carbono, comerciales, baratos y desechables. Tras la optimización de los distintos parámetros, se ha producido un ensayo de 45 minutos de duración, que ha alcanzado un LOD de 2 nM para DA en tampón salino. Además, este método ha permitido la detección de DA endógena en orina. Así, se ha podido realizar una estimación de la concentración de DA endógena presente en una muestra real de orina, que se ha validado realizando un análisis en un laboratorio externo.
- Análisis del biosensado de moléculas no electroactivas usando marcadores no enzimáticos. Para ello se ha desarrollado un inmunoensayo en el que se detectan anticuerpos conjugados a nanocristales de CdS, tras su inmunocaptura y concentración sobre la superficie de PM. La detección electroquímica del CdS se realiza de una manera innovadora, en la que el conexionado con NTC permite el sensado directo de los CdS sin que sea necesaria la disolución de los mismos mediante ácidos para su detección. Así, las CVs realizadas con PM conexionadas con NTC generan unas señales promedio un 300 % superiores que las CVs realizadas sin NTC. Si comparamos los resultados obtenidos con NTC con los que se registran cuando se realiza la detección tras la disolución del CdS, estos son ligeramente inferiores. Sin embargo, la detección por SWV de los CdS sin NTC genera picos mayores, lo que indica que la implementación del conexionado con NTC podría no ser la estrategia más sensible y fácil en esta aplicación concreta. Como ya se discutió en la Subsección 3.2.2, el efecto que generan los NTC en la detección de distintos analitos no es siempre el mismo y la utilización de NTC en la detección electroquímica de distintos analitos no siempre produce el mismo nivel de mejora en las propiedades electrocatalíticas de estos.
- Detección de la MPO para comprobar la aplicabilidad del método al biosensado de analitos y marcadores enzimáticos. La detección de MPO se basa en su

inmuncaptura y concentración utilizando PM-antiMPO. Para la detección electroquímica de la actividad peroxidasa endógena de la MPO se han utilizado sensores serigrafados de carbono y una solución comercial de sustrato enzimático. Los resultados obtenidos han demostrado como el conexionado de las PM con NTC genera una amplificación de la señal registrada por cronopotenciometría y una disminución del LOD. Finalmente, con el ensayo optimizado se han realizado medidas en suero humano inoculado con concentraciones conocidas de MPO, obteniéndose un LOD de 55 ng mL^{-1} de MPO en suero pre-diluido, lo que permite la identificación de individuos con riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

Nanoestructuración de electrodos de capa fina

En la nanoestructuración de electrodos de capa fina, se ha trabajado inicialmente en la optimización y caracterización del protocolo de nanoestructuración para la producción reversible de electrodos mejorados. Estos electrodos han sido entonces aplicados a la detección de moléculas electroactivas en solución y, después, se ha pasado a la optimización de bioensayos mediante el sensado directo de analitos sobre la superficie de las PM. A continuación se detallan las conclusiones extraídas de la optimización y caracterización de estos electrodos nanoestructurados y de las medidas realizadas:

- La nanoestructuración de dispositivos de capa fina con NTC para la producción reversible de electrodos mejorados, se ha optimizado para dos tipos de sensores de Pt y Au, que han sido diseñados para este proyecto y fabricados mediante técnicas fotolitográficas en la sala blanca de IK4-Ikerlan. Los resultados demuestran que el método de nanoestructuración de superficies presentado en este proyecto, el cual se sustenta en el atrapamiento magnético de los compuestos de PM/NTC en la superficie del sensor, es un método rápido, simple, de bajo coste y reutilizable de manera reproducible.
- Detección de moléculas electroactivas, tomando como modelo el AU. En este apartado, por un lado se ha demostrado la aplicabilidad del método de nanoestructuración presentado mediante la detección de AU. Para ello se ha sometido a los electrodos de capa fina a sucesivos procesos de nanoestructuración, detección de analito y lavado, lo cual ha permitido la reutilización de los dispositivos a lo largo del tiempo. Por otro lado se ha comprobado el buen funcionamiento del potencióstato desarrollado en IK4-Ikerlan, que ha producido resultados comparables a los de un potencióstato comercial. La nanoestructuración de los sensores ha generado una disminución en el LOD del ensayo, que ha pasado de $38 \mu\text{M}$ de AU cuando se usan electrodos sin modificar con NTC, a un LOD de $0,86 \mu\text{M}$ de AU en los electrodos nanoestructurados. Adicionalmente, la utilización de los electrodos modificados con NTC ha permitido detectar y estimar la concentración de AU endógeno presente en muestras reales de orina,

obteniéndose unos resultados que concuerdan con los valores fisiológicos de AU esperados según los datos bibliográficos disponibles.

- Sensado directo de dianas no electroactivas sobre las PM. En este caso, las PM se han modificado con un marcador electroactivo (Fc). La captura del analito de la muestra mediante estas PM-Fc produce el sombreado de una parte de los Fc que se encuentran en la superficie de las PM. Por lo tanto, esta captura del analito genera una disminución del pico de Fc en la voltametría. Tras optimizar la modificación de las PM con Fc y el conexionado de los NTC con estos, se ha realizado la detección de dos dianas moleculares no electroactivas: Tween 20 y un anticuerpo biotinilado. Mientras que la unión del detergente a las PM ocurre de manera aleatoria sobre toda la superficie de la misma, la captura del anticuerpo biotinilado se debe a la unión específica del anticuerpo biotinilado a las estreptavidinas que se encuentran en la superficie de las PM. En ambos casos, sin embargo, se ha demostrado que la captura del analito genera un cierto nivel de sombreado de los Fc que se encuentran en la superficie de las PM. A pesar de ello, los LODs obtenidos en este formato de ensayo han sido altos. Por este motivo se propone que una optimización adicional del proceso de incorporación de bioreceptor y marcador electroactivo a las PM, podría generar una mejora significativa de los resultados obtenidos.

Nanoestructuración del electrodo integrado en el cartucho micro uídico

Con el objetivo final de crear un dispositivo portable y automático, que permitiera realizar la nanoestructuración de sensores y las medidas electroquímicas que se han realizado en este proyecto, se ha realizado también la nanoestructuración de electrodos integrados en un cartucho microfluídico. A lo largo de esta tesis se ha demostrado que, en la mayoría de los ensayos desarrollados, la utilización de NTC proporciona una mejora considerable en el LOD del ensayo y el nivel de señal registrado. Por lo tanto, si se quiere obtener esta eficiencia de detección en las medidas realizadas en el cartucho, la nanoestructuración de la superficie del electrodo es un factor fundamental. A continuación se detallan las principales conclusiones extraídas de este apartado:

- Se ha desarrollado y optimizado un protocolo de manipulación, pretratamiento y nanoestructuración del electrodo integrado en el cartucho.
- Detección de moléculas electroactivas, tomando como modelo el AU. De estas medidas se ha concluido que, también en este caso, la mejora en sensibilidad que proporcionan los NTC es importante obteniéndose señales un 300-600 % más altas que las registradas en los sensores sin modificar. Sin embargo, las medidas obtenidas en el cartucho no alcanzan las sensibilidades obtenidas en los electrodos de capa fina fuera del mismo, lo que indica que el proceso de modificación y medida deberán ser mejorados adicionalmente.

9.2. Futuras líneas

Durante el desarrollo de este proyecto se han detectado algunos aspectos específicos que se podrían mejorar y que pueden ser de interés como futuras líneas de investigación en relación con el trabajo realizado. A continuación, se detallan los aspectos que se pueden mejorar y las líneas que se podrían seguir para dar solución a estos problemas.

- En la detección electroquímica del ADN no se consiguió mejorar el LOD al utilizar los NTC respecto de los resultados obtenidos con electrodos sin modificar. Esto se atribuyó al hecho de que los agentes intercalantes que se han ensayado en este trabajo como marcadores electroactivos no eran detectados eficientemente en los electrodos nanoestructurados. Por ejemplo, se observó que el pico de oxidación del azul de metileno se solapaba en las CV con el codo que producen los NTC carboxilados alrededor de 0 V vs Ag.
 - La solución a este inconveniente pasaría por ensayar diferentes marcadores electroactivos mediante distintas técnicas voltamétricas. A este respecto es destacable que, si bien la detección de ADN se llevó a cabo en solución para preservar el estado de los electrodos, la implementación de captura sobre PM y detección directa del marcador por conexionado con NTC tendría un efecto similar pero eficiencia de detección superior.
- En el biosensado de moléculas no electroactivas usando nanocristales de CdS como marcadores no enzimáticos la implementación del conexionado con NTC no ha aportado mejoras significativas a la detección por DPV y SWV. Este hecho se achacó al elevado valor de la corriente de fondo que se registraba para estas medidas en los electrodos nanoestructurados. Sin embargo, un importante número de trabajos describen la utilización de electrodos modificados con NTC para llevar a cabo medidas por DPV y SWV.
 - Dado que la DPV y la SWV se consideran técnicas más sensibles que la CV, y en vista de la mejora aportada por el conexionado con NTC a la mayoría de ensayos detectados por CV a lo largo de esta tesis, sería de gran interés seguir trabajando en la optimización de los parámetros de medida de estas técnicas voltamétricas usando los electrodos nanoestructurados desarrollados hasta ahora. Adicionalmente, se podrían estudiar nanocristales de otros materiales o tamaños, o sustituir estos por otros tipos de nanoestructuras. Por ejemplo, ya que el conexionado con NTC ha generado buenos resultados en la detección del ferroceno y la dopamina, se podrían emplear moléculas de este tipo para modificar nanopartículas que fueran entonces usadas como marcador no-enzimático. Esta estrategia permitiría además la incorporación del marcador en la superficie de la nanoestructura, lo que resulta más compatible con la inmunofuncionalización y el bloqueo físico de la misma para garantizar la especificidad de detección.

- A nuestro parecer, el formato de ensayo más novedoso, versátil y prometedor desarrollado en esta tesis es el biosensado directo de dianas no electroactivas por “sombreado superficial” de PM modificadas con marcadores electroactivos. Se trata de un ensayo sencillo y rápido con el que, sin embargo, se han obtenido unos LODs altos para su aplicación real.
 - El funcionamiento de este tipo de ensayo podría mejorar si se realizara un análisis más detallado de los marcadores electroactivos más convenientes que se pueden utilizar, así como de las posibles estrategias químicas para su incorporación eficiente a la superficie de las PM.
 - La conjugación directa del marcador electroactivo a los bioreceptores, por ejemplo a los anticuerpos, en vez de a la superficie entera de las PM, generaría un sombreado más dirigido y específico y, presumiblemente, unos ensayos más sensibles.
 - La eficiencia de detección podría mejorar también si se implementara un formato de ensayo basado en los ensayos clásicos de agregación, en el que se usaran simultáneamente PM modificadas con 2 o más bioreceptores contra diferentes epítomos de la diana molecular. De esa forma la captura de la misma generaría agregación de las PM, lo cual probablemente produciría mayores niveles de sombreado del marcador superficial.
 - En cualquier caso, la aplicabilidad real de este tipo de formato de ensayo deberá comprobarse en el futuro mediante el estudio de matrices de muestra real.
- El procedimiento de nanoestructuración desarrollado ha sido transferido a la modificación de electrodos integrados en dispositivos microfluídicos. El interés principal de esta parte del trabajo era comprobar si el protocolo de modificación era potencialmente automatizable, algo que se espera mejoraría la reproducibilidad de las superficies producidas. No obstante mediante la nanoestructuración del electrodo integrado en el cartucho microfluídico no se han obtenido las sensibilidades esperadas.
 - La mejora del proceso de nanoestructuración de este tipo de dispositivo pasaría por mejorar la manipulación de los fluidos dentro del cartucho. Por ejemplo, se podría rediseñar la geometría de la cámara y canales de entrada/salida para garantizar una inyección más rápida y localizada de los complejos de PM/NTC y habría que trabajar más extensamente en la optimización de la velocidad de flujo de la inyección del compuesto.
 - Por otra parte, habría que analizar y mejorar la fabricación de los sensores sobre COP y optimizar su nanoestructuración en un intento de determinar si esta resulta menos eficiente que la modificación de los electrodos producidos sobre otros sustratos.
 - Finalmente, sería de gran interés conseguir realizar el mezclado de las PM y los NTC dentro del cartucho microfluídico en un intento de automatizar

el proceso de nanoestructuración de electrodos y generar superficies más reproducibles.

- A pesar de los resultados obtenidos, el conexionado de las PM con NTC presenta algunas limitaciones. Una de las más destacables es la falta de reproducibilidad de los NTC. Muchos autores han discutido las diferencias en comportamiento entre lotes y entre distintas suspensiones de NTC, así como entre los resultados obtenidos en distintos laboratorios. En nuestro caso también hay que tener en cuenta que los NTC se adsorben de forma aleatoria sobre las PM, lo que genera un conexionado y detección electroquímica variable. A esto hay que añadir que el sensado de la superficie de las PM no es total y solamente se detecta parte de las mismas.
 - En este trabajo se ha comprobado que la utilización de PM de $1\ \mu m$ de diámetro promueve un mejor sensado superficial mediante conexionado con NTC que la utilización de PM de $2,8\ \mu m$. Sería interesante estudiar si PM de tamaños menores pueden generar resultados aún mejores.
 - Por otra parte, sería interesante buscar materiales alternativos a los NTC, que aparte de proporcionar las ventajas de disminuir los LODs de los ensayos y amplificar las señales registradas, pudieran también obtener unos resultados más reproducibles.

Bibliografía

- [1] OMS. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014. *www.who.int*.
- [2] UPMC Center for Health Security. Diagnostic Infection at the Point of Care 2013. *www.upmchealthsecurity.org*.
- [3] D. Wei, M. J. A. Bailey, P. Andrew, and T. Ryhänen. Electrochemical biosensors at the nanoscale. *Lab on a Chip*, 9(15):2123–31, August 2009.
- [4] A. Chen and S. Chatterjee. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 42(12):5425–38, June 2013.
- [5] M. Mir, A. Homs, and J. Samitier. Integrated electrochemical DNA biosensors for lab-on-a-chip devices. *Electrophoresis*, 30(19):3386–3397, 2009.
- [6] Z. Taylor L. C. Clark Jr., R. Wolf, D. Granger. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology*, 6:189–193, 1953.
- [7] J. D. Newman and A. P. F. Turner. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20:2435–2453, 2005.
- [8] B. T. Lai, N. W. Chin, A. E. Stanek, W. Keh, and K. W. Lanks. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology*, 4(12):2802–2810, 1984.
- [9] S. P. C. Cole, B. C. Campling, T. Atlaw, D. Kozbor, and J. C. Roder. Human monoclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 62(2):109–120, 1984.
- [10] L. J. Kricka. Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. *Clinical Chemistry*, 40(3):347–357, 1994.
- [11] A. Warsinke, A. Benkert, and F. W. Scheller. Electrochemical immunoassays. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7):622–34, 2000.
- [12] L. Anfossi, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. D Arco, and G. Giraudi. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3):467–80, January 2013.
- [13] N. B. Ramírez, A. M. Salgado, and B. Valdman. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems

- and perspectives. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(02):227–249, 2009.
- [14] S. D. Gan and K. R. Patel. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9):1–3, September 2013.
- [15] A. Villaverde. Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis. *FEBS Letters*, 554(1-2):169–172, November 2003.
- [16] M. Badihi-Mossberg, V. Buchner, and J. Rishpon. Electrochemical Biosensors for Pollutants in the Environment. *Electroanalysis*, 19(19-20):2015–2028, October 2007.
- [17] P. D. Skottrup, M. Nicolaisen, and A. Fejer Justesen. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24:339–348, 2008.
- [18] T. R. J. Holford, F. Davis, and S. P. J. Higson. Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 34(1):12–24, April 2012.
- [19] Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, and C. Fan. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 47:1–11, September 2013.
- [20] M. F. Clark and A. N. Adams. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of general virology*, 34(3):475–483, March 1977.
- [21] M. Aizawa, A. Morioka, and S. Suzuki. Enzyme immunosensor. II. Electrochemical determination of IgG with an antibodybound membrane. *Journal of Membrane Science*, 4:221–228, 1978.
- [22] J. Shen, Y. Li, H. Gu, F. Xia, and X. Zuo. Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions. *Chemical Reviews*, 114(15):7631–7677, 2014.
- [23] A. H. C. Ng, U. Udayasankar, and A. R. Wheeler. Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3):991–1007, June 2010.
- [24] R. M. Pemberton, J. P. Hart, P. Stoddard, and J. A. Foulkes. A comparison of 1-naphthyl phosphate and 4 aminophenyl phosphate as enzyme substrates for use with a screen-printed amperometric immunosensor for progesterone in cows milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(5):495–503, May 1999.
- [25] E. Prats-Alfonso, L. Abad, N. Casañ-Pastor, J. Gonzalo-Ruiz, and E. Baldrich. Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1):163–169, January 2013.
- [26] S. V. Kergaravat, M. I. Pividori, and S. R. Hernandez. Evaluation of seven cosubstrates in the quantification of horseradish peroxidase enzyme by square wave voltammetry. *Talanta*, 88:468–476, January 2012.

- [27] C. Regalado, B. E. García-Almendárez, and M. A. Duarte-Vázquez. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2):243–256, 2004.
- [28] G. Volpe, R. Draisci, G. Palleschi, and D. Compagnone. TMB as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *The Analyst*, 123(June):1303–1307, 1998.
- [29] M. S. Wilson and R. D. Rauh. Hydroquinone diphosphate: an alkaline phosphatase substrate that does not produce electrode fouling in electrochemical immunoassays. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(2):276–283, September 2004.
- [30] E. Baldrich, F. J. del Campo, and F. X. Muñoz. Biosensing at disk microelectrode arrays. Inter-electrode functionalization allows formatting into miniaturised sensing platforms of enhanced sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4):920–926, 2009.
- [31] B. Seiwert and U. Karst. Ferrocene-based derivatization in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1):181–200, January 2008.
- [32] D. Wu, A. Guo, Z. Guo, L. Xie, Q. Wei, and B. Du. Simultaneous electrochemical detection of cervical cancer markers using reduced graphene oxide-tetraethylene pentamine as electrode materials and distinguishable redox probes as labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 54:634–9, April 2014.
- [33] Q. Zhu, Y. Chai, R. Yuan, and Y. Zhuo. Simultaneous detection of four biomarkers with one sensing surface based on redox probe tagging strategy. *Analytica Chimica Acta*, 800:22–8, October 2013.
- [34] L. Ding, A. M. Bond, J. Zhai, and J. Zhang. Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 797:1–12, October 2013.
- [35] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, and D. Tang. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Analytica Chimica Acta*, 758:1–18, January 2013.
- [36] J. A. H. Ho, H. Chang, N. Shih, L. Wu, Y. Chang, C. Chen, and C. Chou. Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. *Analytical Chemistry*, 82(14):5944–50, July 2010.
- [37] X. Cao, Y. Ye, and S. Liu. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Analytical Biochemistry*, 417(1):1–16, October 2011.
- [38] E. Valera, A. Muriano, I. Pividori, F. Sánchez-Baeza, and M. P. Marco. Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 43(508):211–7, May 2013.

- [39] G. Liu, J. Wang, J. Kim, M. R. Jan, and G. E. Collins. Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins. *Analytical Chemistry*, 76(23):7126–30, December 2004.
- [40] G. Liu and Y. Lin. Electrochemical quantification of single-nucleotide polymorphisms using nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*, 129(34):10394–401, August 2007.
- [41] S. Viswanathan, C. Rani, and J. A. Ho. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode. *Talanta*, 94:315–9, May 2012.
- [42] M. I. Prodromidis. Impedimetric immunosensors - a review. *Electrochimica Acta*, 55(14):4227–4233, May 2010.
- [43] P. Bataillard, F. Gardies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, B. Colin, and B. Mandrand. Direct detection of immunospecies by capacitance measurements. *Analytical Chemistry*, 60(21):2374–9, November 1988.
- [44] E. Katz and I. Willner. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, 15(11):913–947, 2003.
- [45] E. Tully, S. P. Higson, and R. O Kennedy. The development of a labelless immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein, Internalin B. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6):906–12, January 2008.
- [46] T. Balkenhohl and F. Lisdat. Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. *Analytica Chimica Acta*, 597(1):50–7, July 2007.
- [47] A. Vig, X. Muñoz Berbel, A. Radoi, M. Cortina-Puig, and J. L. Marty. Characterization of the gold-catalyzed deposition of silver on graphite screen-printed electrodes and their application to the development of impedimetric immunosensors. *Talanta*, 80(2):942–6, December 2009.
- [48] V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, and J. M. Pingarrón. Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11):3365–71, July 2009.
- [49] C. Bian, J. Tong, J. Sun, H. Zhang, Q. Xue, and S. Xia. A field effect transistor (FET)-based immunosensor for detection of HbA1c and Hb. *Biomedical Microdevices*, 13(2):345–52, April 2011.
- [50] Y. Krishnan and F. C. Simmel. Nucleic acid based molecular devices. *Angewandte Chemie*, 50(14):3124–56, March 2011.
- [51] T. Hianik and J. Wang. Electrochemical aptasensors - Recent achievements and perspectives. *Electroanalysis*, 21(11):1223–1235, June 2009.

- [52] E. Palecek and M. Bartosik. Electrochemistry of nucleic acids. *Chemical Reviews*, 112(6):3427–3481, 2012.
- [53] E. G. Hvastkovs and D. A. Buttry. Recent advances in electrochemical DNA hybridization sensors. *The Analyst*, 135(8):1817–29, August 2010.
- [54] F. Lucarelli, G. Marrazza, A. P. F. Turner, and M. Mascini. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6):515–530, January 2004.
- [55] M. Bartošík and E. Paleček. Square Wave Stripping Voltammetry of Unlabeled Single- and Double-Stranded DNAs. *Electroanalysis*, 23(6):1311–1319, June 2011.
- [56] A.H. Kamel, F.T.C. Moreira, C. Delerue-Matos, and M.G.F. Sales. Electrochemical determination of antioxidant capacities in flavored waters by guanine and adenine biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4):591–599, 2008.
- [57] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, and V.C. Diculescu. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 332(2):321–9, September 2004.
- [58] M.K. Patel, P.R. Solanki, A. Kumar, S. Khare, S. Gupta, and B.D. Malhotra. Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12):2586–2591, 2010.
- [59] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U. S. Akarca, M. Mascini, and M. Ozsoz. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta*, 56(5):837–46, April 2002.
- [60] T. H. Fang, N. Ramalingam, D. Xian-Dui, T. S. Ngin, Z. Xianting, A. T. Lai Kuan, E. Y. Peng Huat, and G. Hai-Qing. Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7):2131–2136, 2009.
- [61] N. Prabhakar, K. Arora, H. Singh, and B. D. Malhotra. Polyaniline based nucleic acid sensor. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(15):4808–16, April 2008.
- [62] A. Erdem, K. Kerman, B. Meriç, D. Özkan, P. Kara, and M. Özsöz. DNA Biosensor for Microcystic spp. Sequence Detection by Using Methylene Blue and Ruthenium Complex as Electrochemical Hybridization Labels. *Turkish Journal of Chemistry*, 26:851–862, 2002.
- [63] L. Zhu, R. Zhao, K. Wang, H. Xiang, Z. Shang, and W. Sun. Electrochemical Behaviors of Methylene Blue on DNA Modified Electrode and Its Application to the Detection of PCR Product from NOS Sequence. *Sensors*, 8(9):5649–5660, September 2008.
- [64] M. U. Ahmed, K. Idegami, M. Chikae, K. Kerman, P. Chaumpluk, S. Yamamura, and E. Tamiya. Electrochemical DNA biosensor using a disposable

- electrochemical printed (DEP) chip for the detection of SNPs from unpurified PCR amplicons. *The Analyst*, 132:431–438, 2007.
- [65] K. Goto, H. Horiuchi, H. Shinohara, K. Motegi, K. Hashimoto, S. Hongo, N. Gemma, N. Hayashimoto, T. Itoh, and A. Takakura. Specific and quantitative detection of PCR products from *Clostridium piliforme*, *Helicobacter bilis*, *H. hepaticus*, and mouse hepatitis virus infected mouse samples using a newly developed electrochemical DNA chip. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1):93–99, 2007.
- [66] M. Kobayashi, T. Kusakawa, M. Saito, S. Kaji, M. Oomura, S. Iwabuchi, Y. Morita, Q. Hasan, and E. Tamiya. Electrochemical DNA quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258. *Electrochemistry Communications*, 6(4):337–343, 2004.
- [67] C. J. Squire, L. J. Baker, G. R. Clark, R. F. Martin, and J. White. Structures of m-iodo Hoechst-DNA complexes in crystals with reduced solvent content: implications for minor groove binder drug design. *Nucleic Acids Research*, 28(5):1252–8, March 2000.
- [68] H. Zhao, Z. Li, N. Y. Lee, J. S. Kim, and E. C. Lee. Electrochemical DNA detection using Hoechst dyes in microfluidic chips. *Current Applied Physics*, 12(6):1493–1496, November 2012.
- [69] G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, and M. Anichini. Detection of Human Apolipoprotein E Genotypes by DNA Electrochemical Biosensor Coupled with PCR. *Nucleic Acids Research*, 37:31–37, 2000.
- [70] T. Liu and J. K. Barton. DNA electrochemistry through the base pairs not the sugar-phosphate backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 127(29):10160–1, July 2005.
- [71] E. L. S. Wong and J. J. Gooding. Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor. *Analytical Chemistry*, 78(7):2138–44, April 2006.
- [72] E. L. S. Wong and J. J. Gooding. Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. *Analytical Chemistry*, 75(15):3845–52, August 2003.
- [73] P. Kara, B. Meric, A. Zeytinoglu, and M. Ozsoz. Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples. *Analytica Chimica Acta*, 518(1-2):69–76, 2004.
- [74] K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, H. Karadeniz, Z. Özkan, Z. Erdem, F. Jelen, and M. Özsöz. Electrochemical detection of specific DNA sequences from PCR amplicons on carbon and mercury electrodes using Meldola's Blue as an intercalator. *Turkish Journal of Chemistry*, 28:523–533, 2004.

- [75] K. Maruyama, Y. Mishima, Y. Nakabayashi, and J. Motonaka. Electrochemical characterization and DNA-binding property of dipyrrophenazine complexes of osmium (II). *Nucleic acids symposium series*, (44):59–60, January 2000.
- [76] K. Maruyama, Y. Mishima, K. Minagawa, and J. Motonaka. Electrochemical and DNA-binding properties of dipyrrophenazine complexes of osmium(II). *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 510(1-2):96–102, September 2001.
- [77] T. Deféver, M. Druet, D. Evrard, D. Marchal, and B. Limoges. Real-Time Electrochemical PCR with a DNA Intercalating Redox Probe. *Analytical Chemistry*, 83(5):1815–1821, January 2011.
- [78] E. E. Ferapontova. Electrochemical Indicators for DNA Electroanalysis. *Current Analytical Chemistry*, 7(1):51–62, January 2011.
- [79] A. Tani, A. J. Thomson, and J. N. Butt. Methylene blue as an electrochemical discriminator of single- and double-stranded oligonucleotides immobilised on gold substrates. *The Analyst*, 126(10):1756–1759, 2001.
- [80] S. Delaney and J. K. Barton. Long-range DNA charge transport. *The Journal of organic chemistry*, 68(17):6475–83, August 2003.
- [81] P.E. Nielsen, M. Egholm, and O. Buchardt. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chemistry*, 5(1):3–7, 1994.
- [82] X. Luo, T. M. H. Lee, and I. M. Hsing. Immobilization-Free Sequence-Specific Electrochemical Detection of DNA Using Ferrocene-Labeled Peptide Nucleic Acid. *Analytical Chemistry*, 80(19):7341–7346, 2008.
- [83] X. Luo and I.M. Hsing. Sequence Specific Electrochemical DNA Detection Based on Solution-Phase Competitive Hybridization. *Electroanalysis*, 22(23):2769–2775, December 2010.
- [84] F. Le Floch, H.A. Ho, P. Harding-Lepage, M. Bédard, R. Neagu-Plesu, and M. Leclerc. Ferrocene-Functionalized Cationic Polythiophene for the Label-Free Electrochemical Detection of DNA. *Advanced Materials*, 17(10):1251–1254, May 2005.
- [85] B. Fang, S. Jiao, M. Li, Y. Qu, and X. Jiang. Label-free electrochemical detection of DNA using ferrocene-containing cationic polythiophene and PNA probes on nanogold modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7):1175–1179, 2008.
- [86] X. Luo and I. M. Hsing. Immobilization-free multiplex electrochemical DNA and SNP detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4):803–8, December 2009.
- [87] D. M. Pearce, D. P. Shenton, J. Holden, and C. A. Gaydos. Evaluation of a novel electrochemical detection method for Chlamydia trachomatis: application for point-of-care diagnostics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(3):755–8, March 2011.

- [88] M. G. Roper, C. J. Easley, and J. P. Landers. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Analytical Chemistry*, 77(12):3887–93, June 2005.
- [89] L. Garibyan and N. Avashia. Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3):1–4, March 2013.
- [90] L. Chen, A. Manz, and P. J. R. Day. Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 7(11):1413–23, November 2007.
- [91] M. Bu, T. Melvin, G. Ensell, J. S. Wilkinson, and A. G. R. Evans. Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13:125–130, 2003.
- [92] P. Belgrader, W. Bennett, D. Hadley, G. Long, R. Mariella, F. Milanovich, S. Nasarabadi, W. Nelson, J. Richards, and P. Stratton. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clinical Chemistry*, 44(10):2191–4, October 1998.
- [93] M. A. Northrup. A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. *Analytical Chemistry*, 70(5):918–22, March 1998.
- [94] J. Felbel, I. Bieber, J. Pipper, and J. M. Köhler. Investigations on the compatibility of chemically oxidized silicon (SiO_x)-surfaces for applications towards chip-based polymerase chain reaction. *Chemical Engineering Journal*, 101(1-3):333–338, August 2004.
- [95] J. Khandurina, T. E. McKnight, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote, and J. M. Ramsey. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 72(13):2995–3000, July 2000.
- [96] C. G. Koh, W. Tan, M. Zhao, A. J. Ricco, and Z. H. Fan. Integrating polymerase chain reaction, valving, and electrophoresis in a plastic device for bacterial detection. *Analytical Chemistry*, 75(17):4591–8, September 2003.
- [97] S. Kwakye, V. N. Goral, and A. J. Baeumner. Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentiostat. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12):2217–23, June 2006.
- [98] T. M. H. Lee, M. C. Carles, and I. M. Hsing. Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection. *Lab on a Chip*, 3(2):100–5, May 2003.
- [99] H. Li, G. Xue, and E. S. Yeung. Selective detection of individual DNA molecules by capillary polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 73(7):1537–43, April 2001.
- [100] V. García-Cañas, R. González, and A. Cifuentes. Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16):4497–502, July 2002.

- [101] P. Belgrader, C. J. Elkin, and S. B. Brown. A reusable flow-through polymerase chain reaction instrument for the continuous monitoring of infectious biological agents. *Analytical Chemistry*, 75(14):3446–3450, 2003.
- [102] S. S. W. Yeung, T. M. H. Lee, and I. M. Hsing. Electrochemical real-time polymerase chain reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 128(41):13374–5, October 2006.
- [103] G. Binnig and C.F. Quate. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56:930–933, 1986.
- [104] F. Valentini and G. Palleschi. Nanomaterials and Analytical Chemistry. *Analytical Letters*, 41(4):479–520, March 2008.
- [105] O. A. Sadik, S. K. Mwilu, and A. Aluoch. Smart electrochemical biosensors: From advanced materials to ultrasensitive devices. *Electrochimica Acta*, 55(14):4287–4295, 2010.
- [106] C. Hu and S. Hu. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensors: Principles and Applications in Biomedical Systems. *Journal of Sensors*, 2009(iv):1–40, 2009.
- [107] L. Wu, E. Xiong, X. Zhang, and J. Chen. Nanomaterials as signal amplification elements in DNA-based electrochemical sensing. *Nano Today*, 9(2):197–211, April 2014.
- [108] A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schiling, B. H. Weigl, and P. Yager. A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. *Nature Biotechnology*, 19:461–465, 2001.
- [109] I. Y. Goon, L. M. H. Lai, M. Lim, R. Amal, and J. J. Gooding. Dispersible electrodes: a solution to slow response times of sensitive sensors. *Chemical Communications*, 46(46):8821–3, December 2010.
- [110] L. M. H. Lai, I. Y. Goon, M. Lim, D. B. Hibbert, R. Amal, and J. J. Gooding. Gold-coated magnetic nanoparticles as "dispersible electrodes" Understanding their electrochemical performance. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656:130–135, 2011.
- [111] E. Verpoorte. Beads and chips: new recipes for analysis. *Lab on a Chip*, 3(4):60N–68N, November 2003.
- [112] E. Zacco, M. I. Pividori, and S. Alegret. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry*, 78(6):1780–1788, 2006.
- [113] O. Laczka, J. M. Maesa, N. Godino, J. del Campo, M. Fougat-Hansen, J. P. Kutter, D. Snakenborg, F. X. Muñoz Pascual, and E. Baldrich. Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(8):3633–40, April 2011.

- [114] F. Berti, S. Laschi, I. Palchetti, J. S. Rossier, F. Reymond, M. Mascini, and G. Marrazza. Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. *Talanta*, 77(3):971–8, January 2009.
- [115] X. Luo, J. Xu, J. Barford, and I. M. Hsing. Magnetic particle based electrochemical sensing platform for PCR amplicon detection. *Electrochemistry Communications*, 12(4):531–534, April 2010.
- [116] S. Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354:56–58, 1991.
- [117] P. Yáñez Sedeño, J. M. Pingarrón, J. Riu, and F. X. Rius. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9):939–953, October 2010.
- [118] C. B. Jacobs, M. J. Peairs, and B. J. Venton. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta*, 662(2):105–27, March 2010.
- [119] S. K. Vashist, D. Zheng, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, and F. S. Sheu. Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnology Advances*, 29(2):169–88, 2011.
- [120] N. G. Sahoo, S. Rana, J. W. Cho, L. Li, and S. H. Chan. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progress in Polymer Science*, 35(7):837–867, July 2010.
- [121] S. D. Bergin, Z. Sun, P. Streich, J. Hamilton, and J. N. Coleman. New solvents for nanotubes: Approaching the dispersibility of surfactants. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114:231–237, 2010.
- [122] S. B. Hocevar, J. Wang, R. P. Deo, M. Musameh, and B. Ogorevc. Carbon Nanotube Modified Microelectrode for Enhanced Voltammetric Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate. *Electroanalysis*, 17(5-6):417–422, March 2005.
- [123] K. Balasubramanian and M. Burghard. Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*, 1(2):180–192, February 2005.
- [124] M. Chhowalla, K. B. K. Teo, C. Ducati, N. L. Rupesinghe, G. A. J. Amaratunga, A. C. Ferrari, D. Roy, J. Robertson, and W. I. Milne. Growth process conditions of vertically aligned carbon nanotubes using plasma enhanced chemical vapor deposition. *Journal of Applied Physics*, 90(10):5308, 2001.
- [125] M. Kumar and Y. Ando. Chemical Vapor Deposition of Carbon Nanotubes: A Review on Growth Mechanism and Mass Production. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(6):3739–3758, June 2010.
- [126] F. Banhart. Interactions between metals and carbon nanotubes: at the interface between old and new materials. *Nanoscale*, 1(2):201–13, November 2009.

- [127] N. Nemeč, D. Tománek, and G. Cuniberti. Contact dependence of carrier injection in carbon nanotubes: an ab initio study. *Physical Review Letters*, 96(7):1 4, 2006.
- [128] C. E. Banks, A. Crossley, C. Salter, S. J. Wilkins, and R. G. Compton. Carbon nanotubes contain metal impurities which are responsible for the “electrocatalysis” seen at some nanotube-modified electrodes. *Angewandte Chemie*, 45(16):2533 7, April 2006.
- [129] M. Pumera. Voltammetry of carbon nanotubes and graphenes: excitement, disappointment, and reality. *The Chemical Record*, 12(1):201 13, February 2012.
- [130] F. C. Moraes, M. F. Cabral, L. H. Mascaro, and S. A. S. Machado. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. *Surface Science*, 605(3-4):435 440, February 2011.
- [131] I. Streeter, G. G. Wildgoose, L. Shao, and R. G. Compton. Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: An analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(2):462 466, August 2008.
- [132] L. Siegert, D. K. Kampouris, J. Kruusma, V. Sammelselg, and C. E. Banks. The Heterogeneity of Multiwalled and Single-Walled Carbon Nanotubes: Iron Oxide Impurities Can Catalyze the Electrochemical Oxidation of Glucose. *Electroanalysis*, 21(1):48 51, January 2009.
- [133] A. Chou, T. Bocking, N. K. Singh, and J. J. Gooding. Demonstration of the importance of oxygenated species at the ends of carbon nanotubes for their favourable electrochemical properties. *Chemical Communications*, (7):842 4, February 2005.
- [134] J. Li, H. T. Ng, A. Cassell, W. Fan, H. Chen, Q. Ye, J. Koehne, J. Han, and M. Meyyappan. Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection. *Nano Letters*, 3(5):597 602, May 2003.
- [135] P. J. Britto, K. S. V. Santhanam, and P. M. Ajayan. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(1):121 125, 1996.
- [136] X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, and F. Papadimitrakopoulos. Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. *Electrochemistry Communications*, 5:408 411, 2003.
- [137] Y. Wang, L. Liu, M. Li, S. Xu, and F. Gao. Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1):107 11, December 2011.
- [138] J. V. Veetil and K. Ye. Development of Immunosensors Using Carbon Nanotubes. *Biotechnology Progress*, 23:517 531, 2007.

- [139] J. Okuno, K. Maehashi, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, and E. Tamiya. Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10):2377–81, April 2007.
- [140] G. Liu, H. Chen, H. Peng, S. Song, J. Gao, J. Lu, M. Ding, L. Li, S. Ren, Z. Zou, and C. Fan. A carbon nanotube-based high-sensitivity electrochemical immunosensor for rapid and portable detection of clenbuterol. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1):308–13, October 2011.
- [141] S. G. Wang, R. Wang, P. J. Sellin, and Q. Zhang. DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325:1433–1437, 2004.
- [142] X. Zhang, K. Jiao, S. Liu, and Y. Hu. Hybridization Biosensor Based on the Interaction of DNA with Single-Walled Carbon Nanotubes. *Analytical Chemistry*, 81(15):6006–6012, 2009.
- [143] Y. Ye and H. Ju. Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:735–741, 2005.
- [144] O. A. Loaiza, R. Laocharoensuk, J. Burdick, M. C. Rodríguez, J. M. Pingarron, M. Pedrero, and Joseph Wang. Adaptive orientation of multifunctional nanowires for magnetic control of bioelectrocatalytic processes. *Angewandte Chemie*, 46(9):1508–11, January 2007.
- [145] B. Pérez-López and A. Merkoçi. Magnetic Nanoparticles Modified with Carbon Nanotubes for Electrocatalytic Magnetoswitchable Biosensing Applications. *Advanced Functional Materials*, 21(2):255–260, January 2011.
- [146] E. Baldrich, R. Gómez, G. Gabriel, and F. X. Muñoz. Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: application to dopamine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5):1876–82, January 2011.
- [147] E. Baldrich and F. X. Muñoz. Carbon Nanotube Wiring: A Tool for Straightforward Electrochemical Biosensing at Magnetic Particles. *Analytical Chemistry*, 83(24):9244–9250, November 2011.
- [148] J. Ding, Q. Gao, X. S. Li, W. Huang, Z. G. Shi, and Y. Q. Feng. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic carbon nanotube for the determination of estrogens in milk. *Journal of Separation Science*, 34(18):2498–504, September 2011.
- [149] R. Olivé-Monllau, F. X. Muñoz Pascual, and E. Baldrich. Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: Application to paracetamol detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185:685–693, August 2013.

- [150] H. P. Le. Progress and trend in ink-jet printing technology. *Journal of Imaging Science and Technology*, 42(1):49–62, 1998.
- [151] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 1(1-6):244–248, 1990.
- [152] S. Choi, M. Goryll, L. Y. M. Sin, P. K. Wong, and J. Chae. Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(2):231–247, June 2011.
- [153] H. Ben-Yoav, P. H. Dykstra, W. E. Bentley, and R. Ghodssi. A microfluidic-based electrochemical biochip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1):114–120, 2012.
- [154] P. N. Nge, C. I. Rogers, and A. T. Woolley. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chemical Reviews*, 113:2550–2583, 2013.
- [155] A. Ríos, M. Zougagh, and M. Avila. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Analytica Chimica Acta*, 740:1–11, 2012.
- [156] L. Gervais, N. de Rooij, and E. Delamarche. Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics. *Advanced Healthcare Materials*, 23(24):H151–176, June 2011.
- [157] E. Verpoorte and N. F. De Rooij. Microfluidics meets MEMS. *Proceedings of the IEEE*, 91(6):930–953, June 2003.
- [158] C. D. Chin, V. Linder, and S. K. Sia. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 12(12):2118–2134, June 2012.
- [159] I. E. Araci and P. Brisk. Recent developments in microfluidic large scale integration. *Current Opinion in Biotechnology*, 25:60–68, February 2014.
- [160] D. J. Laser and J. G. Santiago. A review of micropumps. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14(6):R35–R64, June 2004.
- [161] A. Chaubey and B.D. Malhotra. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6-7):441–456, June 2002.
- [162] B. Kasemo. Biological surface science. *Surface Science*, 500(1-3):656–677, March 2002.
- [163] A. J. Brand and L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley Online Library, 2001.
- [164] A. C. Fisher. *Electrode Dynamics*. Oxford University Press, 1996.
- [165] A. Fick. On Liquid Diffusion. *Physical Magazine and Journal of Science*, 10(30), 1855.

- [166] R. García-González, A. Costa-García, and M. T. Fernández-Abedul. Dual screen-printed electrodes with elliptic working electrodes arranged in parallel or perpendicular to the strip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 198:302–308, July 2014.
- [167] N. Modirshahla, M. A. Behnajady, and S. Kooshaiian. Investigation of the effect of different electrode connections on the removal efficiency of Tartrazine from aqueous solutions by electrocoagulation. *Dyes and Pigments*, 74(2):249–257, January 2007.
- [168] V. Mir eski, S. Komorsky-Lovri , and M. Lovri . *Square-wave voltammetry: theory and application*. Springer, 2007.
- [169] F. Lisdat and D. Schäfer. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5):1555–67, July 2008.
- [170] D. Salinas-Torres, F. Huerta, F. Montilla, and E. Morallón. Study on electro-active and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 56:2464–2470, 2011.
- [171] M. D. Steinberg and C. R. Lowe. A micropower amperometric potentiostat. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 97(2-3):284–289, February 2004.
- [172] V. Beni, V. I. Ogurtsov, N. V. Bakunin, D. W..M. Arrigan, and M. Hill. Development of a portable electroanalytical system for the stripping voltammetry of metals: Determination of copper in acetic acid soil extracts. *Analytica Chimica Acta*, 552(1-2):190–200, November 2005.
- [173] A. Hildebrandt, J. Ribas, R. Bragós, J. L. Marty, M. Tresàñchez, and S. Lacorte. Development of a portable biosensor for screening neurotoxic agents in water samples. *Talanta*, 75(5):1208–13, June 2008.
- [174] J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslund, O. Hammerich, and J. Pingarrón. Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. *The Analyst*, 121:345–350, 1996.
- [175] C. Barbero and R. Kötz. Electrochemical activation of glassy carbon. *Journal of the Electrochemical Society*, 140(1):1–6, 1993.
- [176] B.W. Allen and C.A. Piantadosi. Electrochemical activation of electrodes for amperometric detection of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 8:243–252, 2003.
- [177] F. Laouenan, L. G. Monsalve, A. Goiriëna, M. Agirregabiria, and J. M. Ruano-Lopez. A Self-contained Diagnostic Platform for DNA Concentration, Elution, and qPCR Inside a LabCard with Stored Reagents. *Procedia Engineering*, 47:1484–1490, January 2012.
- [178] J.M. Ruano-López, M. Agirregabiria, G. Olabarria, D. Verdoy, D.D. Bang, M. Bu, A. Wolff, A. Voigt, J.A. Dziuban, R. Walczak, and J. Berganzo. The SmartBioPhone, a point of care vision under development through two

- European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL. *Lab on a Chip*, 9(11):1495–9, June 2009.
- [179] Z. Herrasti, I. Etxabe, J.M. Mitxelena, I. Gabilondo, M.P. Martínez, and F. Martínez. Development and integration of an electrochemical system in a LOC device for DNA detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 189:66–70, December 2013.
- [180] J. Wang, F. Wang, and S. Dong. Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 626(1-2):1–5, February 2009.
- [181] Y. Yan, M. Zhang, K. Gong, L. Su, Z. Guo, and L. Mao. Adsorption of methylene blue dye onto carbon nanotubes: a route to an electrochemically functional nanostructure and its layer-by-layer assembled nanocomposite. *Chemistry of Materials*, 17:3457–3463, 2005.
- [182] U. Yogeswaran and S. M. Chen. Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130(2):739–749, March 2008.
- [183] S. Yang, G. Li, R. Yang, M. Xia, and L. Qu. Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid in the presence of high concentration of ascorbic acid using multi-walled carbon nanotubes with methylene blue composite film-modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15(9):1909–1918, October 2010.
- [184] M. Castaño Álvarez, M. T. Fernández-Abedul, and A. Costa-García. Electroactive intercalators for DNA analysis on microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 28:4679–4689, 2007.
- [185] W. Dauer and S. Przedborski. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39(September 11):889–909, 2003.
- [186] C. C. Chernecky and B. J. Berger. *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures, 5th Edition*. Elsevier Health Sciences, 2008.
- [187] L. A. Dubois and D. K. Gray. Dopamine-secreting pheochromocytomas: in search of a syndrome. *World Journal of Surgery*, 29(7):909–913, July 2005.
- [188] J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves, and A. Falcão. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples a review. *Analytica Chimica Acta*, 768:12–34, March 2013.
- [189] B. Habibi and M. H. Pournaghi-Azar. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry. *Electrochimica Acta*, 55(19):5492–5498, July 2010.

- [190] Z. Liu, J. Wang, D. Xie, and G. Chen. Polyaniline coated Fe₃O₄ nanoparticle carbon nanotube composite and its application in electrochemical biosensing. *Small*, 4(4):462–6, April 2008.
- [191] F. Li, L. Mei, Y. Li, K. Zhao, H. Chen, P. Wu, Y. Hu, and S. Cao. Facile fabrication of magnetic gold electrode for magnetic beads-based electrochemical immunoassay: application to the diagnosis of Japanese encephalitis virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10):4253–6, June 2011.
- [192] N. F. Atta, A. Galal, and E. H. El-Ads. Gold nanoparticles-coated poly(3,4-ethylene-dioxythiophene) for the selective determination of sub-nano concentrations of dopamine in presence of sodium dodecyl sulfate. *Electrochimica Acta*, 69:102–111, May 2012.
- [193] Z. Herrasti, F. Martínez, and E. Baldrich. Electrochemical detection of dopamine using streptavidin-coated magnetic particles and carbon nanotube wiring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 203:891–898, November 2014.
- [194] J. Barallat, R. Olivé-Monllau, J. Gonzalo-Ruiz, R. Ramírez-Satorras, F. X. Muñoz Pascual, A. G. Ortega, and E. Baldrich. Chronoamperometric magneto-immunosensor for myeloperoxidase detection in human plasma based on a magnetic switch produced by 3D laser sintering. *Analytical Chemistry*, 85(19):9049–56, October 2013.
- [195] L. Woods, S. Badescu, and T. Reinecke. Adsorption of simple benzene derivatives on carbon nanotubes. *Physical Review B*, 75(15):155415, April 2007.
- [196] J. Ping, J. Wu, Y. Wang, and Y. Ying. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 34(1):70–6, April 2012.
- [197] J. Yan, S. Liu, Z. Zhang, G. He, P. Zhou, H. Liang, L. Tian, X. Zhou, and H. Jiang. Simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on graphene anchored with Pd/Pt nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111:392–397, 2013.
- [198] C. Xue, Q. Han, Y. Wang, J. Wu, T. Wen, R. Wang, J. Hong, X. Zhou, and H. Jiang. Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, 49:199–203, May 2013.
- [199] F. Araújo de Souza Ribeiro, C. R. Teixeira Tarley, K. Bastos Borges, and A. C. Pereira. Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of Cucurbita pepo L. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185:743–754, August 2013.
- [200] S. J. Li, J. Z. He, M. J. Zhang, R. X. Zhang, X. L. Lv, S. H. Li, and H. Pang. Electrochemical detection of dopamine using water-soluble sulfonated graphene. *Electrochimica Acta*, 102:58–65, July 2013.

- [201] P. Rattanarat, W. Dungchai, W. Siangproh, O. Chailapakul, and C. S. Henry. Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 744:1–7, September 2012.
- [202] A. Liu, M. D. Wei, I. Honma, and H. Zhou. Biosensing Properties of Titanate Nanotube Films: Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate and Uric Acid. *Advanced Functional Materials*, 16(3):371–376, 2006.
- [203] L. Wu, L. Feng, J. Ren, and X. Qu. Electrochemical detection of dopamine using porphyrin-functionalized graphene. *Biosensors and Bioelectronics*, 34(1):57–62, April 2012.
- [204] R. N. Goyal, V. K. Gupta, N. Bachheti, and R. A. Sharma. Electrochemical Sensor for the Determination of Dopamine in Presence of High Concentration of Ascorbic Acid Using a Fullerene-C60 Coated Gold Electrode. *Electroanalysis*, 20(7):757–764, April 2008.
- [205] Z. D. Peterson and D. C. Collins. Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis electrospray ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 776:221–229, 2002.
- [206] T. Okumura, Y. Nakajima, M. Matsuoka, and T. Takamatsu. Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 694(2):305–316, July 1997.
- [207] D.S. Goldstein, G.Z. Feuerstein, I.J. Kopin, and H.R. Keiser. Validity of liquid chromatography with electrochemical detection for measuring dopamine in human plasma. *Clinica Chimica Acta*, 117(2):113–120, 1981.
- [208] M. Alvelos, A. Ferreira, P. Bettencourt, P. Serrão, M. Pestana, M. Cerqueira-Gomes, and P. Soares-Da-Silva. The effect of dietary sodium restriction on neurohumoral activity and renal dopaminergic response in patients with heart failure. *The European Journal of Heart Failure*, 6(5):593–599, August 2004.
- [209] R. Siener, A. Jahnen, and A. Hesse. Influence of a mineral water rich in calcium, magnesium and bicarbonate on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallization. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(2):270–276, February 2004.
- [210] W. M. Li, Y. H. Chou, C. C. Li, C. C. Liu, S. P. Huang, W. J. Wu, C. W. Chen, C. Y. Su, M. H. Lee, Y. C. Wei, and C. H. Huang. Association of body mass index and urine pH in patients with urolithiasis. *Urological research*, 37(4):193–196, August 2009.
- [211] T. P. Taylor, M. G. Janech, E. H. Slate, E. C. Lewis, J. M. Arthur, and J. C. Oates. Overcoming the effects of matrix interference in the measurement of urine protein analytes. *Biomarker Insights*, 7:1–8, January 2012.

- [212] K. Vuorensola, H. Siren, and U. Karjalainen. Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 788(2):277–289, 2003.
- [213] M. Noroozifar, M. Khorasani-Motlagh, R. Akbari, and M. Bemanadi Parizi. Simultaneous and sensitive determination of a quaternary mixture of AA, DA, UA and Trp using a modified GCE by iron ion-doped natrolite zeolite-multiwall carbon nanotube. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1):56–63, October 2011.
- [214] Q. Liu, X. Zhu, Z. Huo, X. He, Y. Liang, and M. Xu. Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using PVP/graphene modified electrodes. *Talanta*, 97:557–62, August 2012.
- [215] T. C. Tsai, F. H. Huang, and J. J. Chen. Selective detection of dopamine in urine with electrodes modified by gold nanodendrite and anionic self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181:179–186, May 2013.
- [216] T. C. Canevari, P. A. Raymundo-Pereira, R. Landers, E. V. Benvenutti, and S. A. S. Machado. Sol gel thin-film based mesoporous silica and carbon nanotubes for the determination of dopamine, uric acid and paracetamol in urine. *Talanta*, 116:726–735, November 2013.
- [217] C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhang, F. Hu, and M. Zhang. Au-nanoclusters incorporated 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole film modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1):315–9, December 2011.
- [218] X. Tian, C. Cheng, H. Yuan, J. Du, D. Xiao, S. Xie, and M. M. F. Choi. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles- β -cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry. *Talanta*, 93:79–85, May 2012.
- [219] Y. Zhang, W. Ren, and S. Zhang. Simultaneous Determination of Epinephrine, Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid by Polydopamine-nanogold Composites Modified Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 8:6839–6850, 2013.
- [220] D. Sun, Q. Zhao, F. Tan, X. Wang, and J. Gao. Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using SnO₂ nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode. *Analytical Methods*, 4(10):3283, 2012.
- [221] J. J. Colleran and C. B. Breslin. Simultaneous electrochemical detection of the catecholamines and ascorbic acid at PEDOT/S- β -CD modified gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 667:30–37, February 2012.
- [222] E. Alipour, M. R. Majidi, A. Saadatirad, S. M. Golabi, and A. M. Alizadeh. Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples

- on the pretreated pencil graphite electrode. *Electrochimica Acta*, 91:36–42, February 2013.
- [223] D. Yu, Y. Zeng, Y. Qi, T. Zhou, and G. Shi. A novel electrochemical sensor for determination of dopamine based on AuNPs@SiO₂ core-shell imprinted composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1):270–7, 2012.
- [224] L. M. Niu, K. Q. Lian, H. M. Shi, Y. B. Wu, W. J. Kang, and S. Y. Bi. Characterization of an ultrasensitive biosensor based on a nano-Au/DNA/nano-Au/poly(SFR) composite and its application in the simultaneous determination of dopamine, uric acid, guanine, and adenine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178:10–18, March 2013.
- [225] M. Rajkumar, B. Devadas, and S. M. Chen. Electrochemical synthesis of dysprosium hexacyanoferrate micro stars incorporated multi walled carbon nanotubes and its electrocatalytic applications. *Electrochimica Acta*, 105:439–446, August 2013.
- [226] P. Wu, T. Zhao, S. Wang, and X. Hou. Semiconductor quantum dots-based metal ion probes. *Nanoscale*, 6(1):43–64, January 2014.
- [227] F. Y. Kong, B. Y. Xu, J. J. Xu, and H. Y. Chen. Simultaneous electrochemical immunoassay using CdS/DNA and PbS/DNA nanochains as labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1):177–82, January 2013.
- [228] A. Merkoçi, L. H. Marcolino-Junior, S. Marín, O. Fatibello-Filho, and S. Alegret. Detection of cadmium sulphide nanoparticles by using screen-printed electrodes and a handheld device. *Nanotechnology*, 18(3):035502, January 2007.
- [229] P. Sobrova, M. Ryvolova, J. Hubalek, V. Adam, and R. Kizek. Voltammetry as a Tool for Characterization of CdTe Quantum Dots. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7):13497–510, January 2013.
- [230] Z. Herrasti, F. Martínez, and E. Baldrich. Carbon nanotube wiring for signal amplification of electrochemical magneto immunosensors: application to myeloperoxidase detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406:5487–5493, July 2014.
- [231] M. L. Brennan, M. S. Penn, F. Van Lente, V. Nambi, M. H. Shishehbor, R. J. Aviles, M. Goormastic, M. L. Pepoy, E. S. McErlean, E. J. Topol, S. E. Nissen, and S. L. Hazen. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *The New England journal of medicine*, 349(17):1595–1604, January 2003.
- [232] D. Lau and S. Baldus. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 111(1):16–26, 2006.
- [233] S. Baldus, C. Heeschen, T. Meinertz, A. M. Zeiher, J. P. Eiserich, T. Münzel, M. L. Simoons, and C. W. Hamm. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 108(12):1440–5, September 2003.

- [234] M. C. Meuwese, E. S. G. Stroes, S. L. Hazen, J. N. van Miert, J. A. Kuivenhoven, R. G. Schaub, N. J. Wareham, R. Luben, J. J. P. Kastelein, K. T. Khaw, and S. M. Boekholdt. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(2):159–65, July 2007.
- [235] B. McDonnell, S. Hearty, W. J. J. Finlay, and R. O Kennedy. A high-affinity recombinant antibody permits rapid and sensitive direct detection of myeloperoxidase. *Analytical Biochemistry*, 410(1):1–6, March 2011.
- [236] K. C. Lin, V. Kunduru, M. Bothara, K. Rege, S. Prasad, and B. L. Ramakrishna. Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(10):2336–42, June 2010.
- [237] V. L. Venkatraman, R. K. Reddy, F. Zhang, D. Evans, B. Ulrich, and S. Prasad. Iridium oxide nanomonitors: clinical diagnostic devices for health monitoring systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(10):3078–83, June 2009.
- [238] L. Lu, B. Liu, S. Li, W. Zhang, and G. Xie. Improved electrochemical immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on nanogold/cerium dioxide-BMIMPF₆/L-Cysteine composite film. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2):339–44, September 2011.
- [239] L. Lu, B. Liu, C. Liu, and G. Xie. Amperometric Immunosensor for Myeloperoxidase in Human Serum Based on a Multi-wall Carbon Nanotubes-Ionic Liquid-Cerium Dioxide Film-modified Electrode. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(11):3259–3264, November 2010.
- [240] B. Liu, L. Lu, Q. Li, and G. Xie. Disposable electrochemical immunosensor for myeloperoxidase based on the indium tin oxide electrode modified with an ionic liquid composite film containing gold nanoparticles, poly(o-phenylenediamine) and carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 173(3-4):513–520, March 2011.
- [241] Z. Herrasti, R. Olivé-Monllau, F. X. Muñoz Pascual, F. Martínez, and E. Baldrich. Electrochemical biosensing of non-electroactive targets using ferrocene-labeled magnetic particles and CNT wiring. *The Analyst*, 139(6):1334–9, February 2014.
- [242] S. Mohtashami, M. R. Howlader, and T. Doyle. Comparative Electrochemical Investigation of Pt, Au and Ti Electrodes on Liquid Crystal Polymer for the Application of Neuromuscular Prostheses. *ECS Transactions*, 35(16):23–33, 2011.
- [243] J. C. Fanguy and C. S Henry. The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 23(5):767–73, March 2002.

- [244] D. Lakshmi, M. J. Whitcombe, F. Davis, P. S. Sharma, and B. B. Prasad. Electrochemical Detection of Uric Acid in Mixed and Clinical Samples: A Review. *Electroanalysis*, 23(2):305–320, February 2011.
- [245] J. Du, R. Yue, F. Ren, Z. Yao, F. Jiang, P. Yang, and Y. Du. Simultaneous determination of uric acid and dopamine using a carbon fiber electrode modified by layer-by-layer assembly of graphene and gold nanoparticles. *Gold Bulletin*, 46(3):137–144, May 2013.
- [246] J. Du, R. Yue, F. Ren, Z. Yao, F. Jiang, P. Yang, and Y. Du. Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 53:220–4, March 2014.
- [247] S. M. Li, S. Y. Yang, Y. S. Wang, C. H. Lien, H. W. Tien, S. T. Hsiao, W. H. Liao, H. P. Tsai, C. L. Chang, C. M. Ma, and C. C. Hu. Controllable synthesis of nitrogen-doped graphene and its effect on the simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Carbon*, 59:418–429, August 2013.
- [248] S. Zhou, H. Shi, X. Feng, K. Xue, and W. Song. Design of templated nanoporous carbon electrode materials with substantial high specific surface area for simultaneous determination of biomolecules. *Biosensors and Bioelectronics*, 42:163–9, April 2013.
- [249] M. I. Khan, A. J. Haque, and K. Kim. Electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid on electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 700:54–59, 2013.
- [250] Z. Temoçin. Modification of glassy carbon electrode in basic medium by electrochemical treatment for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176:796–802, January 2013.
- [251] X. J. Huang, H. S. Im, O. Yarimaga, J. H. Kim, D. H. Lee, H. S. Kim, and Y. K. Choi. Direct electrochemistry of uric acid at chemically assembled carboxylated single-walled carbon nanotubes netlike electrode. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(43):21850–6, November 2006.
- [252] A. F. Holloway, D. A. Craven, L. Xiao, J. del Campo, and G. G. Wildgoose. Developing Random Network Theory for Carbon Nanotube Modified Electrode Voltammetry: Introduction and Application to Estimating the Potential Drop between. *Journal of Physical Chemistry C*, 112:13729–13738, 2008.
- [253] B. A. Kerwin. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biopharmaceuticals: structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8):12–17, 2008.
- [254] M. Kamaruzaman and A. Esen. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and Western blots. *Journal of Immunological Methods*, 117(1):141–145, 1989.

- [255] M. Steinitz. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. *Analytical Biochemistry*, 282(2):232–8, July 2000.
- [256] P. Garidel, C. Hoffmann, and A. Blume. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation. *Biophysical Chemistry*, 143(1-2):70–8, July 2009.
- [257] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. DeMello, and J. B. Edel. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Analytical Chemistry*, 80(18):7063–7, September 2008.
- [258] S. Guo, C. Ray, A. Kirkpatrick, N. Lad, and B. B. Akhremitchev. Effects of multiple-bond ruptures on kinetic parameters extracted from force spectroscopy measurements: revisiting biotin-streptavidin interactions. *Biophysical Journal*, 95(8):3964–76, October 2008.
- [259] V. Tsouti, C. Boutopoulos, P. Andreakou, M. Ioannou, I. Zergioti, D. Goustouridis, D. Kafetzopoulos, D. Tsoukalas, P. Normand, and S. Chatzandroulis. Detection of the biotin streptavidin interaction by exploiting surface stress changes on ultrathin Si membranes. *Microelectronic Engineering*, 86:1495–1498, April 2009.
- [260] Y. J. Yuan, Y. Zhao, and W. L. Xu. Characterization of molecular interactions of an immobilized biotinylated monolayer and streptavidin-coated microspheres by bond-rupture scanning. *Analytica Chimica Acta*, 680:59–64, November 2010.
- [261] C. I. L. Justino, T. A. P. Rocha-Santos, and A. C. Duarte. Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes. *Trends in Analytical Chemistry*, 45:24–36, April 2013.
- [262] J. N. Tey, I. P. M. Wijaya, Z. Wang, W. H. Goh, A. Palaniappan, S. G. Mhaisalkar, I. Rodriguez, S. Dunham, and J. A. Rogers. Laminated, microfluidic-integrated carbon nanotube based biosensors. *Applied Physics Letters*, 94:013107, 2009.
- [263] J. Kim, J. Elsnab, C. Gehrke, J. Li, and B. K. Gale. Microfluidic integrated multi-walled carbon nanotube (MWCNT) sensor for electrochemical nucleic acid concentration measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185:370–376, August 2013.
- [264] S. I. Yang, K. F. Lei, S. W. Tsai, and H. T. Hsu. Development of a paper-based carbon nanotube sensing microfluidic device for biological detection. In *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, volume 2013, pages 168–71, January 2013.
- [265] S. Wang, L. Li, H. Jin, T. Yang, W. Bao, S. Huang, and J. Wang. Electrochemical detection of hepatitis B and papilloma virus DNAs using SWCNT

array coated with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 41:205
10, March 2013.

A. Anexo

A.1. Máscaras utilizadas en la tesis diseñadas en CleWin 4

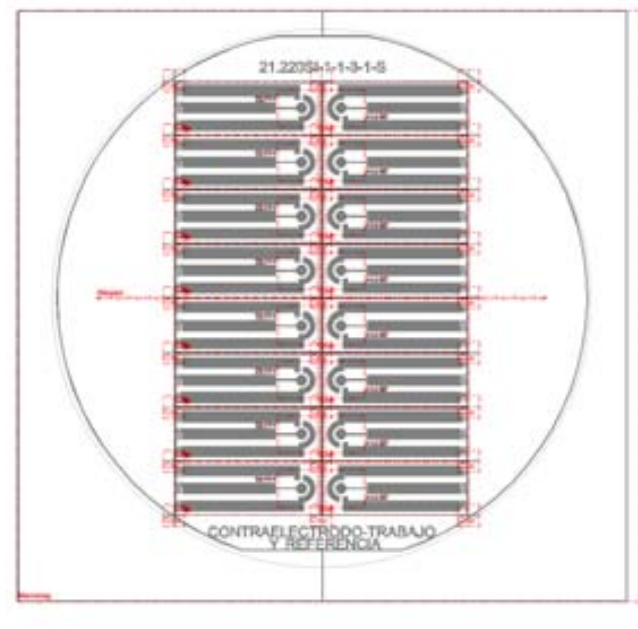


Figura A.1.: Diseño de la máscara de acetato del chip con WE, CE y RE de Pt.



Figura A.2.: Diseño de la máscara de acetato de los chips con WE de Au y RE y CE de Pt.

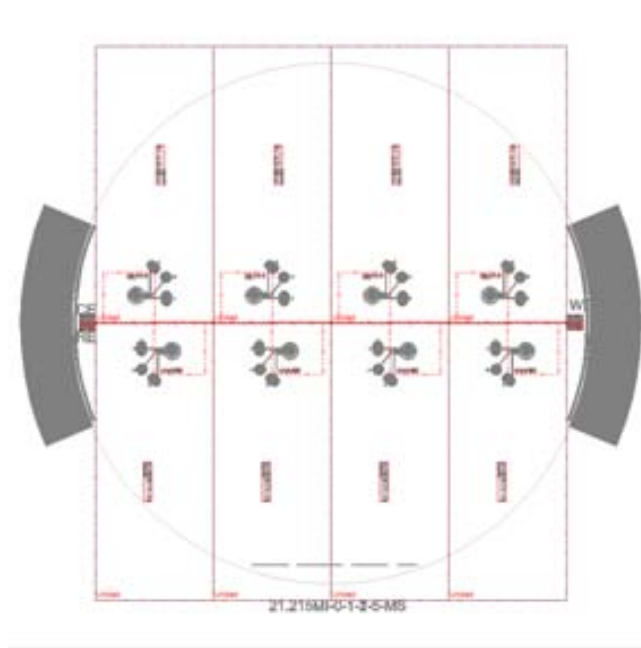


Figura A.3.: Diseño de la máscara de acetato de la metalización del sensor con WE, RE, CE de Pt en la lámina de COP.

A.2. Contribuciones científicas

A.2.1. Publicaciones

A.2.1.1. Development and integration of an electrochemical system in a LOC device for DNA detection



Development and integration of an electrochemical system in a LOC device for DNA detection

Z. Herrasti*, I. Etxabe, J.M. Mitxelena, I. Gabilondo, M.P. Martínez, F. Martínez

IK4-Ikerlan Technological Research Centre, 20500 Mondragón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 8 January 2013

Keywords:

LOC
Electrochemical detection system
DNA

ABSTRACT

In this work we have developed an electrochemical detection system with the aim to simplify and reduce the cost of a Lab on a Chip (LOC) device in the case of qualitative DNA detection measurements. In addition to the optical detection system of the LOC device, an electrochemical detection module has been developed.

The LOC system consists of a portable platform-reader actuator and a disposable labcard capable of performing nucleic acid concentration and amplification. The sample is injected in the labcard and after the elution of the DNA, it is transferred to the PCR chamber, where the DNA is amplified and transferred to the detection chamber.

The electrochemical detection module is based on a self-developed potentiostat/galvanostat, which is integrated in the LOC system. In order to see the reliability of the fabricated device, it is compared to the commercial potentiostat Autolab. The electrochemical sensor used for the measurements is integrated in the detection chamber of the labcard.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

LOC devices have achieved a wide popularity as they have opened the possibility of portable analysis in contrast to complex laboratory assay. The portability and cheapness of these devices makes them very promising for developing countries that do not have access to expensive laboratory equipment.

The advances made in microfluidics, have enabled the use of small sample volumes and the delivery of results in a short time, which are key factors for the development of LOC devices [1]. According to the detection methods used in LOCs, most of the fabricated devices are based on optical detection, but the use of an electrochemical detection system can provide significant advantages for the commercialization of these devices [2–4]. Electrochemistry detection can provide high sensitivity in addition to low cost, fast response and small dimensions which are key factors for a portable device [5]. The portability of point of care (POC) tests is a challenge as most of the developed LOC devices require a trained technician and limited laboratory equipment. To fulfill the requirements to construct a portable device, the main objective of this work is to develop a low cost system with integrated electrodes and electronics [6], which improves the signal to noise ratio of the electrochemical sensor.

The developed LOC device is used for DNA qualitative detection, i.e. it determines if the target that is wanted to be measured is in the analyzed sample or not. At the moment, point-of-care (POC) tests for nucleic acid testing are very limited and remain unreliable for targets that require quantization [7]. In addition, as for the detection of dsDNA no surface immobilization step or prior measurement probe labeling is required in our proposal, the fabricated detection system can be used for the detection of any target of DNA enabling a wide range of applications.

For the electrochemical detection of DNA, Methylene Blue (MB) intercalator is used. An intercalator is chosen for the measurements, because although an approach exploiting the inherent electrochemical activity of DNA is possible, the irreversible oxidation and the high oxidation potentials of the nucleobases difficultate this detection method. MB is one of the most widely used intercalators [8] and unlike redox labeled DNA sequences, it does not need the chemical conjugation of the redox label to the DNA strand, simplifying and reducing the cost of the assay.

In this paper, the fabricated device is described in detail firstly. Then, the electrochemical detection system and the electrochemical module control board are presented, as well as the integration of the electrochemical sensor in the labcard. Finally, in Section 3, the good operation of the developed electrochemical device is demonstrated by comparing it to a commercial potentiostat and by realizing some measurements of Methylene Blue intercalator detection and dsDNA detection.

* Corresponding author. Tel.: +34 943712400.

E-mail address: zherrasti@ikerlan.es (Z. Herrasti).

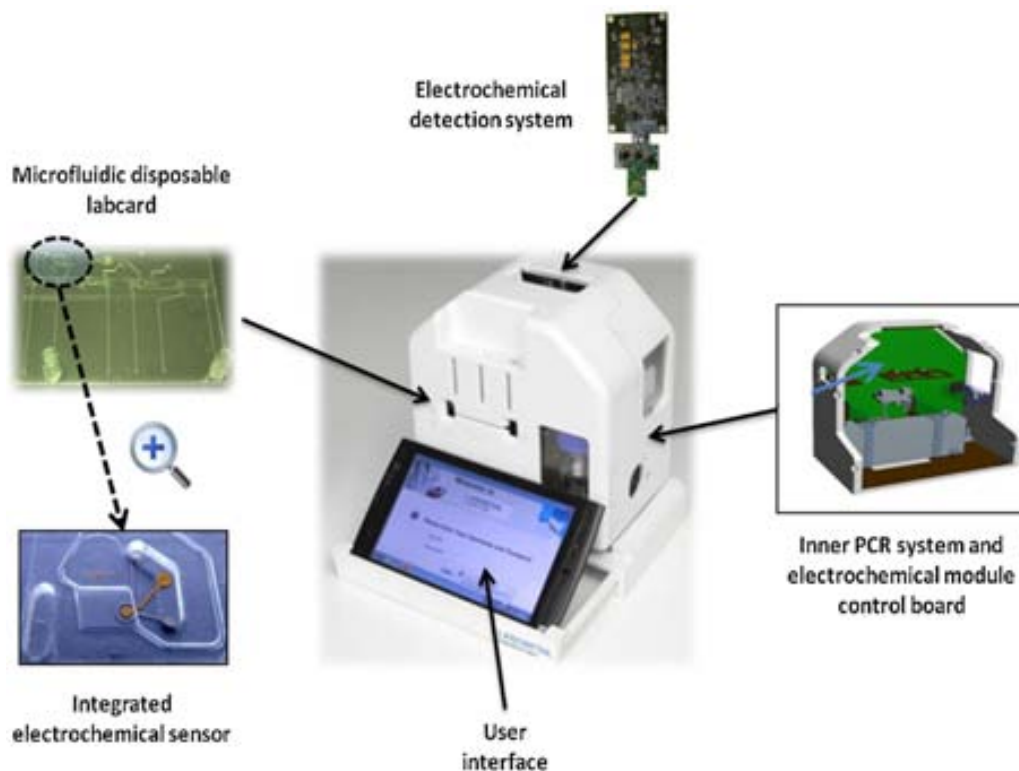


Fig. 1. LOC device with integrated electrochemical detection system and inner electrochemical module control board.

2. Experimental

2.1. Materials

Methylene Blue (dye content, $\geq 82\%$) was purchased from Sigma–Aldrich. Methylene Blue dissolutions were prepared in PBS (phosphate buffered saline) 0.01 M pH 7.4, purchased from Sigma–Aldrich. The DNA used for the measurements was 4nmole Ultramer™ DNA Oligo synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT). The DNA had the following sequence: 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAA GAT TTG-3', with a guanine cytosine content of 30% and a molecular weight of 38,867.1. For the dilution of the DNA sample nuclease-free water purchased from Qiagen was used.

2.2. Device description

In Fig. 1, the general scheme of the fabricated LOC device is shown. A potentiostat/galvanostat based electrochemical system (EDS) is implemented in the LOC device [9], whereas an electrochemical sensor is integrated in the microfluidic disposable labcard and an inner PCR system and an electrochemical module control board are also added.

In the following paragraphs the implementations made to the LOC device are explained in more detail.

2.2.1. Electrochemical detection system (EDS)

The block diagram of the fabricated electrochemical module is shown in Fig. 2. This system relies on a potentiostat/galvanostat system, which is needed to control three electrode cell electroanalytical tests.

In the developed module, input impedance higher than $82\text{ G}\Omega$ is achieved by making a guarding of the input signal, which will therefore decrease the error in regards to the applied reference voltage.

Besides, the fabricated EDS is able to measure with a resolution better than 0.2 nA in a $\pm 10\text{ }\mu\text{A}$ current range.

2.2.2. Integration of the electrochemical sensor in the microfluidic disposable labcard

The electrochemical sensor is integrated in the electrochemical detection chamber of the labcard. Gold and platinum electrodes are deposited by sputtering on a sheet of COP (cyclic olefin polymer) with $100\text{ }\mu\text{m}$ thickness. The microfluidic cartridge is fabricated by injection molding and the metalized sheet with the electrochemical sensor is stick to the cartridge by an adhesive sheet which closes all the valves and the rest of the cartridge. The volume of the electrochemical detection chamber is of $10\text{ }\mu\text{l}$.

The integrated electrochemical sensor is shown in Fig. 3. The working electrode is made of gold with a radius of 0.5 mm , and the reference and counter electrodes are made of platinum.

2.2.3. Electrochemical module control board

The control board is used to control both the inner PCR system of the device and the electrochemical module. It applies measurement and control techniques to the electrochemical cell, in order to obtain useful information from the DNA amplification process.

The control board incorporates some modules: excitation signal generation for the electrochemical cell, signal conditioning, returning signal processing from the electrochemical cell and interface-control board communication.

3. Results and discussion

The EDS is tested and compared to a commercial potentiostat. Once the EDS is working successfully, the optimal concentration of Methylene Blue (MB) and the parameters of the square wave

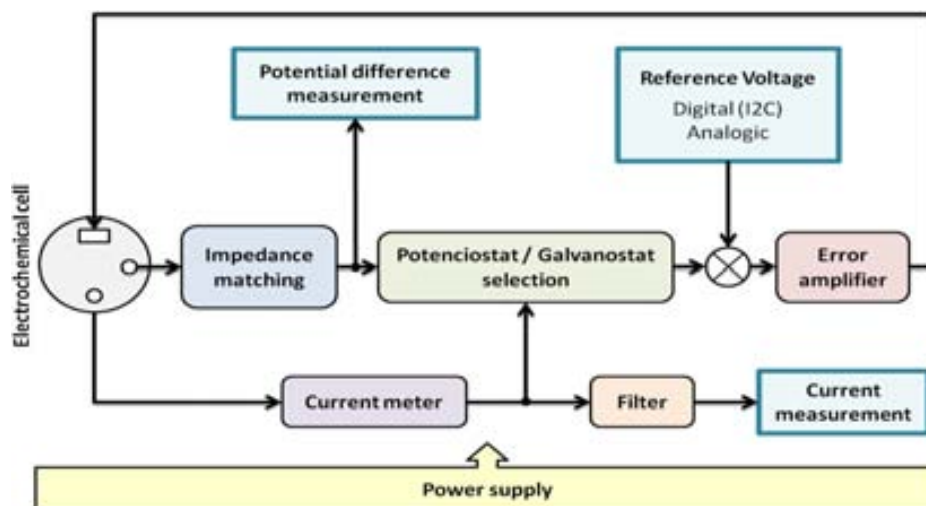


Fig. 2. Potentiostat/galvanostat design.

voltammetry (SWV) for the detection of MB are optimized. Then, different concentrations of IDT synthesized dsDNA are measured with MB. Finally, the PCR conditions are optimized to perform measurements in the final integrated device.

For the calibration of the electrochemical sensor, measurements with 4nmole Ultramer™ DNA Oligo synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) were performed outside the microfluidic labcard in an electrochemical sensor identical to the integrated sensor. For that, a DNA sample with low guanine cytosine content (30%) was chosen. It is known that the GC content can influence the binding of MB to dsDNA. As MB preferentially binds to guanine, MB will intercalate less to a low GC content dsDNA. Because of that, we can conclude that if our electrochemical sensor is able to detect a dsDNA with low GC content, it will detect many different DNA samples, that are used in different applications.

3.1. Comparison of the developed electrochemical detection system with Autolab

The developed electrochemical system is tested and compared with a commercial Autolab PGSTAT obtaining identical results in the performed tests. In Fig. 4, the square wave voltammograms (SWVs) of 20 μM Methylene Blue (MB), a redox indicator, are shown. The SWV obtained with Autolab, shows the redox peak at -0.501 V vs Pt and the peak current is $0.336\ \mu\text{A}$. In the case of the SWV obtained with the fabricated EDS, the potential of the redox peak is -0.455 V vs Pt and the current $0.364\ \mu\text{A}$.



Fig. 3. Electrochemical sensor with gold working electrode and platinum reference and counter electrodes, integrated in the labcard.

3.2. Measurements of different concentrations of MB

In Fig. 5, different concentrations of MB are measured to check the reproducibility of the electrochemical sensor. The dissolutions of MB are prepared in 0.01 M PBS (phosphate buffered saline). The variability of the measurements is acceptable as the coefficient of variation ($\%CV < 10$) for all the concentrations. For the following measurements 20 μM MB is chosen, because it was found that a higher concentration of MB gave problems for the detection of DNA.

3.3. Optimization of SWV parameters for MB detection

SWV technique [10] is used for the measurements, as it is the voltammetry technique that is proven to give the best results for the application. It offers the advantages of high sensitivity, great speed and low detection limit. For the optimization of the square wave frequency, the potential step $E_{\text{step}} = 1.25\text{ mV}$ and the amplitude $A = 50\text{ mV}$ of the square wave pulse are set.

In Fig. 6, a calibration graph is shown where the measured peak currents and their variations for different frequencies from 10 to 90 Hz are represented. The higher the frequency used in the voltammetry is, the higher the obtained current will be, but also its variation. Thus, 30 Hz frequency is chosen as the optimal.

3.4. Electrochemical detection of dsDNA

The main application of the EDS is to measure different concentrations of DNA. For the electrochemical detection, SWVs of solutions of Methylene Blue with different concentrations of DNA are measured. The dsDNA is free in solution enabling the reusability of the electrochemical sensor. When MB is added to amplified dsDNA, the MB intercalates in dsDNA and as the concentration of dsDNA increases, the concentration of MB free in solution decreases [11,12]. The interaction of MB with dsDNA is due to electrostatic binding between positively charged MB and negatively charged backbone phosphate of DNA, and because of the intercalation of the aromatic ring of MB between bases where the insertion of MB between two successive DNA base pairs takes place due to favorable π -stacking interactions [13,14].

The SWV is performed at a 30 Hz frequency, a step potential of 1.25 mV and an amplitude of 50 mV. As it is shown in Fig. 7, the electrochemical sensor is able to distinguish different concentrations of DNA by analyzing the decrease in peak current of MB. In Fig. 8 a calibration graph is shown, where the values are normalized

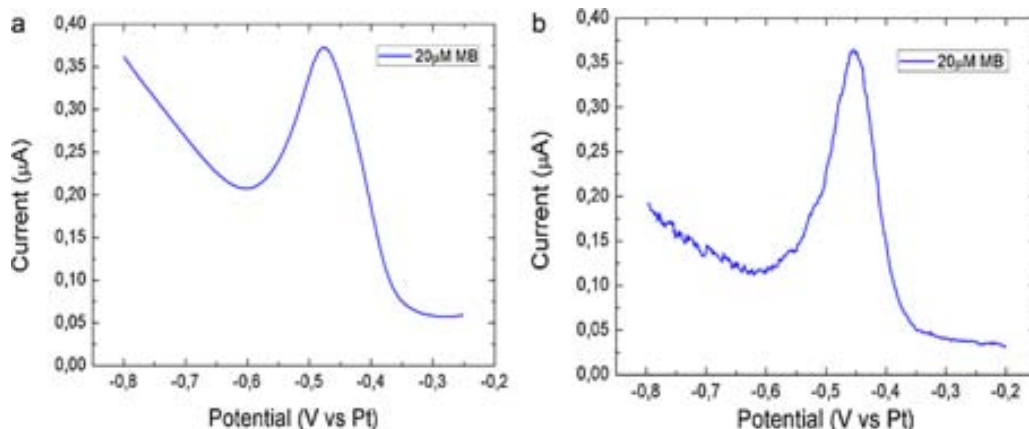


Fig. 4. SWVs of 20 μM MB in 0.01 M PBS pH 7.4 performed in (a) Autolab and in (b) the developed EDS.

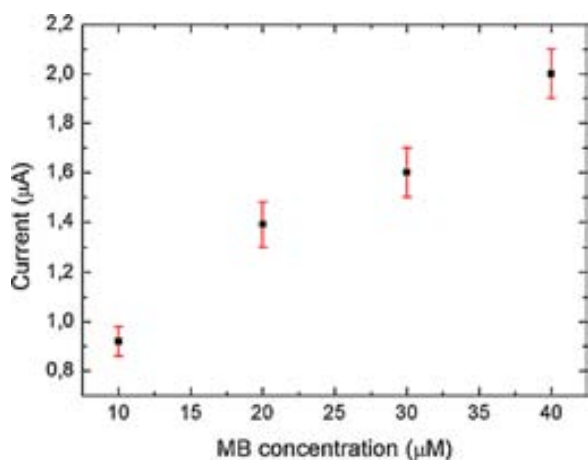


Fig. 5. Calibration graph for different concentrations of MB in PBS 0.01 M. Four different SWV measurements were performed for each concentration of MB, where the coefficient of variation (%CV < 10) for all the concentrations.

to the peak current of 20 μM MB. Here, the values are obtained in four different measurements to check the repeatability of the procedure. In Table 1, the statistic values of these measurements are indicated. In this case the coefficient of variation (%CV < 10), except for one concentration of DNA, but this happens for a very

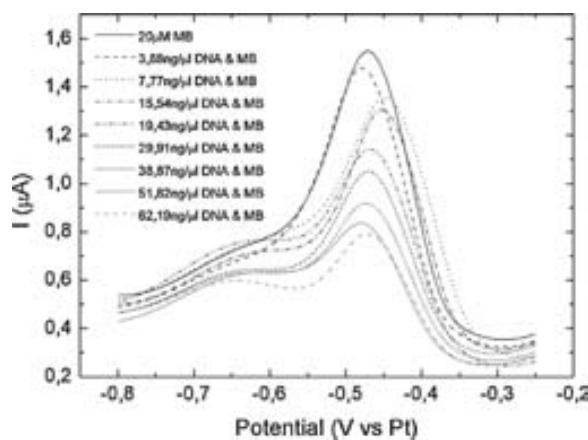


Fig. 7. SWVs of MB at different concentrations of dsDNA in solution.

high concentration, so it is not problematic as the peak current is in all the cases lower than the 20 μM MB peak current and for a qualitative DNA detection this is sufficient.

The detection limit of the EDS is 4 ng/μl and considering that the measured solutions in the system will be previously amplified, this detection limit is lower than the detection limit needed for the LOC device [15].

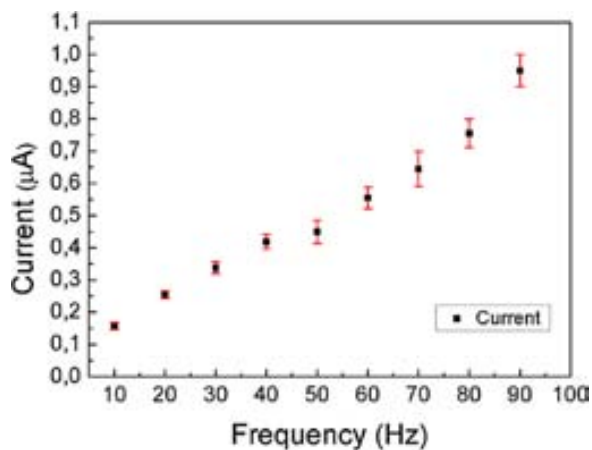


Fig. 6. Calibration graph of 20 μM MB in PBS 0.01 M changing the frequency of the square wave. Four different SWV measurements were performed at each square wave frequency.

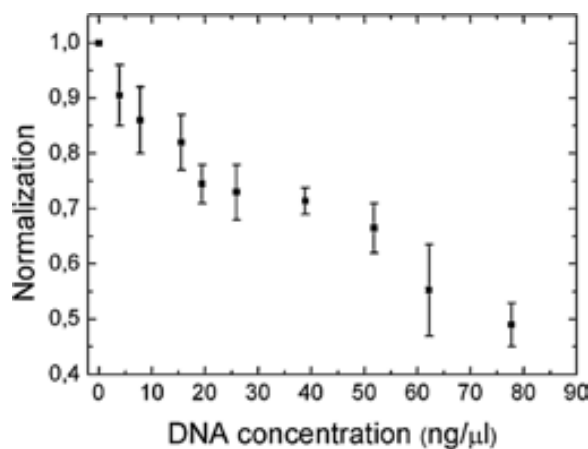


Fig. 8. Deviation curve for different concentrations of dsDNA. Four measurements were performed for each concentration and the obtained redox peak currents were normalized to the redox peak current value of 20 μM MB that was obtained in the same sensor.

Table 1

Mean values and statistic values of 4 measurements, for samples with 20 μM MB concentration and dsDNA concentration from 0 ng/ μl to 77.735 ng/ μl .

DNA concentration (ng/ μl)	Normalization	Standard deviation	%CV
0	1		
3.88	0.905	0.055	6.07
7.77	0.86	0.06	6.98
15.54	0.82	0.05	6.10
19.43	0.745	0.035	4.70
25.91	0.73	0.05	6.85
38.87	0.714	0.024	3.36
51.82	0.665	0.045	6.77
62.19	0.5525	0.082	14.84
77.735	0.49	0.04	8.16

3.5. PCR amplification and electrochemical detection performed in the labcard

Once the electrochemical sensor is demonstrated to work successfully with IDT synthesized DNA, a 72 bp product is amplified from RNaseP human gene with the forward 5'-AGATTGG-ACCTGCGAGCG-3' and reverse 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3' primers, in the PCR chamber [16] of the microfluidic cartridge. The thermocycling protocol is the following: for the initial denaturation 95 °C are maintained during 10 s and for the PCR the following procedure is repeated 40 times, 5 s at 95 °C and 20 s at 60 °C.

This amplified DNA has been measured in the integrated electrochemical sensor of the microfluidic labcard by inserting the MB in the microfluidic platform. However, the mixing of MB with amplified DNA in the microfluidic labcard has not been optimized yet. Therefore, electrochemical measurements of the whole integrated process are not shown in this article.

4. Conclusions

The addition of the described electrochemical detection system to the LOC, has enabled the fabrication of a low cost, fast response and small dimension device. Although the EDS is not able to make quantitative measurement of DNA, it is able to make qualitative measurements with a detection limit that is enough for the desired application, i.e. for the detection of previously amplified DNA.

References

- [1] L. Chen, A. Manz, P.J.R. Day, Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices, *Lab on a Chip* 7 (2007) 1413–1423.
- [2] C.D. Chin, V. Linder, S.K. Sia, Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab on a Chip* 12 (2012) 2118–2134.
- [3] X. Luo, I.-M. Hsing, Electrochemical techniques on sequence-specific PCR amplification detection for point-of-care applications, *Analyst* 134 (2009) 1957–1964.
- [4] M. Mir, A. Homs, J. Samitier, Integrated electrochemical DNA biosensors for lab-on-a-chip devices, *Electrophoresis* 30 (2009) 3386–3397.
- [5] O.A. Sadik, S.K. Mwilu, A. Aluoch, Smart electrochemical biosensors: from advanced materials to ultrasensitive devices, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 4287–4295.
- [6] S. Schumacher, J. Nestler, T. Otto, M. Wegener, E. Ehrentreich-Förster, D. Michel, K. Wunderlich, S. Palzer, K. Sohn, A. Weber, M. Burgard, A. Grzeziak, A. Teichert, A. Brandenburg, B. Koger, J. Albers, E. Nebling, F.F. Bier, Highly integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis, *Lab on a Chip* 12 (2012) 464–473.
- [7] E. Paleček, M. Bartošík, Electrochemistry of nucleic acids, *Chemical Reviews* 112 (2012) 3427–3481.
- [8] E.E. Ferapontova, Electrochemical indicators for DNA electroanalysis, *Current Analytical Chemistry* 7 (2011) 51–62.
- [9] J.M. Ruano-López, F. Laouenan, M. Agirregabiria, V. Azkarraga, J. Berganzo, K. Mayora, *Imagineno NanoBio&Med*, Bilbao Exhibition Centre, 2011, April.
- [10] V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007.
- [11] T.H. Fang, N. Ramalingam, D. Xian-Dui, T.S. Ng, Z. Xianting, A.T.L. Kuan, E.Y.P. Huat, G. Hai-Qing, Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 2131–2136.
- [12] M.K. Patel, P.R. Solanki, A. Kumar, S. Khare, S. Gupta, B.D. Malhotra, Electrochemical DNA sensors for *Neisseria meningitidis* detection, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2586–2591.
- [13] E. Farmaji, L. Clima, K.V. Gothelf, E. Ferapontova, DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific, *Analyst* 135 (2010) 1443–1448.
- [14] M. Castaño-Álvarez, A. Fernández-la-Villa, M.T. Fernández-Abedul, A. Costagarcía, MCE-electrochemical detection for following interactions of ssDNA and dsDNA with Methylene Blue, *Electrophoresis* 30 (2009) 1943–1948.
- [15] C.S.J. Hou, N. Milovic, M. Godin, P.R. Russo, R. Chakrabarti, S.R. Manalis, Label-free microelectronic PCR amplification, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2526–2531.
- [16] J.M. Ruano-López, M. Agirregabiria, G. Olabarria, D. Verdoy, D.D. Bang, M. Bu, A. Wolff, A. Voigt, J.A. Dziuban, R. Walczak, J. Berganzo, The SmartBioPhone™ a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL, *Lab on a Chip* 9 (2009) 1495–1499.

Biographies

Ms. Zorione Herrasti was graduated in Physics and she received her M.S. degree in Nanoscience from Universidad del País Vasco (Spain) in 2010 and 2011 respectively. She developed her master thesis “Fabrication and characterization of electrochemical sensors” in IK4-Ikerlan. Currently she is doing her PhD thesis on “Nanostructured surfaces based on carbon nanotube magnetic entrapment for electrochemical biosensors” in IK4-Ikerlan.

Mr. Iñaki Etxabe received his B.S. and M.S. degrees in Telecommunications Engineering at Navarra University (Spain) in 2010. He developed his master thesis “Development of conditioning electronics for microelectrodes based biosensors” in IK4-Ikerlan. Currently he is working at CEGASA GROUP, where he develops embedded systems for stationary and traction energy storage system based in lithium ion.

Dr. José María Mitxelena was graduated in E.E.A. (Electronics, Electrotechnics and Automation) from Paul Sabatier University (Toulouse, France) where he also obtained his PhD degree in E.E.A. in 1983. Since 1983, he has been working as a researcher in IK4-Ikerlan, first in the Department of Industrial Instrumentation and then in the Sensors Department. He has a large experience in the design and development of both analogic and digital circuits.

Mr. Iosu Gabilondo received his B.S. and M.S. degrees in Telecommunications Engineering at Mondragon University (Spain) in 2006 and 2009 respectively. He started his professional activity in the Electronics Department at IK4-Ikerlan in 2010, and he is currently working in the Sensors Department. He has participated in various industry focused projects, addressing client’s technological needs and his main research activities include electronic circuit design and development.

Mrs. María Pía Martínez was graduated in Physics from Navarra University (Spain) in 1982. She has been working in IK4-Ikerlan as a researcher since 1984, first in the Industrial Instrumentation Department and then in the Sensors Department. She has a large experience in sensing of products and industrial processes, signal treatment, data and image processing, optic fiber sensors, SAWs and currently she is working on electrochemical biosensors.

Dr. Fernando Martínez has received his B.S. degree in Industrial Engineering at Mondragon University (Spain) and his M.S. degree in Automation and Electronics Engineering at University Paul Sabatier (France). He obtained his PhD in Industrial Engineering at Institut National Polytechnique de Toulouse (France) in 1993. Currently, he is the head of the Sensors Department at IK4-Ikerlan. His research activities include design and development of sensors and their application to the monitoring of products and industrial processes. He has participated and coordinated several national and international research projects in domains related to: design of transducers, autonomous sensor integration, optoelectronic systems, mechatronic systems and intelligent structures. He has published many research papers in journals and international conferences.

A.2.1.2. Electrochemical biosensing of non-electroactive targets using ferrocene-labeled magnetic particles and CNT wiring

Electrochemical biosensing of non-electroactive targets using ferrocene-labeled magnetic particles and CNT wiring†

 Cite this: *Analyst*, 2014, 139, 1334

 Received 10th December 2013
 Accepted 8th January 2014

 Zorione Herrasti,^a Rosa Olivé-Monllau,^b Francesc Xavier Muñoz-Pascual,^{bc}
 Fernando Martínez^a and Eva Baldrich†^{*b}

DOI: 10.1039/c3an02276e

www.rsc.org/analyst

We show that target binding onto ferrocene-modified magnetic microparticles (MP-Fc) promotes physical sheltering of the labels. This can be measured electrochemically by CNT wiring, which enhances ten-fold the signals registered compared to direct detection of the MPs alone. As a proof of concept, detection of detergents and antibodies is accomplished. In these preliminary experiments, random binding of 0.01% Tween 20 onto MP-Fc was detectable both voltammetrically and impedimetrically after a 2 min incubation. Furthermore, affinity capture of 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of biotinylated antibody by streptavidin MP-Fc could be measured in less than 30 min and even in the presence of 1 mg mL^{-1} of BSA.

Electroactive molecules, such as ferrocene (Fc) derivatives, have been extensively used as labels in electroanalysis and biosensor development.^{1,2} Using Fc-labeled biorecognition ligands, like antibodies or nucleic acid probes, allows the optimization of enzyme-less sandwich bioassays by straightforward monitoring of the redox reporter at an electrode surface.^{1,2} Additional improvement is feasible by incorporating metal or carbon nanostructures, able to display high numbers of ligands and label units, as signal amplifiers.^{1,3,4} Furthermore, simpler and faster assays have been reported by modifying the electrode surface directly with Fc-labeled bioreceptors. In this case, target binding to the bioreceptor affects accessibility of Fc moieties to ions and/or their physical microenvironment, which translates directly into changes in the electrode response.^{5–8} In any case,

and independent of the assay format, detection of electroactive labels is only effective in the close vicinity of the electrode surface. This has presumably limited their utilization in affinity assays performed at the surface of micrometric magnetic particles (MPs), which are generally detected *via* substrate addition to enzymatic labels or by acid dissolution of metal nanocrystals.^{9,10}

Using MPs for target binding allows enhanced sample mixing, highly active surface areas per sample volume, good biocomponent stability, and fast kinetic processes compared to capture performed on a two-dimensional sensor surface. In addition, MP-bound molecules can be physically separated from other components present in the sample and can be easily concentrated onto the electrode surface for subsequent electrochemical detection.^{9,10} CNT incorporation to the electrode surface, on the other hand, increases the electrode roughness and effective area, provides electrocatalytic activity towards a variety of molecules, and improves electron transfer.^{11–13} The combination of the unique properties of MPs and carbon nanotubes (CNTs) has allowed the production of magnetic nanocomposites with numerous applications, including the fast, simple and reversible production of CNT-electrodes.^{14–19} Magnetically assembled CNT-electrodes have been efficiently applied to the direct detection of electroactive molecules in solution^{16,17} and, following MP modification with appropriate bioreceptors and/or enzymes, were also used for the development of bioassays using enzymatic labels.^{18–23}

It has been suggested that CNT magnetic coentrapment, which relies on random physisorption of CNTs onto the surface of MPs, also provides wiring of the beads with the electrode surface.¹⁵ As a result, large MP surface areas can be electrochemically monitored compared to MPs layered alone onto the sensor. In this work, we investigate whether CNT wiring could be exploited for the enzyme-less electrochemical detection of non-electroactive molecules. This is done here by monitoring physical sheltering produced by target binding onto ferrocene-labeled MPs (MP-Fc). For the electrochemical detection, devices that include Pt working disk (2 mm Φ), and reference and

^aIK4-Ikerlan Technological Research Centre, 20500 Mondragón, Spain

^bInstitut de microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC), Esfera UAB, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

^cMATGAS A. I. E., Campus UAB, 08193 Bellaterra, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed materials and method section. SEM images of M28 and T1 MPs before and after SWCNT wiring. DPVs of MP-Fc detected directly *via* SWCNT wiring. Characterization of PM/SWCNT electrodes by EIS. See DOI: 10.1039/c3an02276e

‡ Current address: Molecular Biology and Biochemistry Research Center for Nanomedicine (Cibbim-Nanomedicine), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel: +34 934 893 000; E-mail: eva.baldrich@vhir.org

counter electrodes were fabricated by standard photolithography. For a detailed description of the materials and methodology, refer to the ESI.†

We first produced MP-Fc and studied the effect of various parameters on SWCNT wiring in order to improve the efficiency of MP surface electrochemical monitoring. For that purpose, streptavidin-coated MPs of two different sizes were assayed in parallel (M280, 2.8 μm Φ and T1, 1 μm Φ). Modification with Fc was performed by EDC/NHS chemistry and increasing concentrations of Fc-COOH (2 mM, 4 mM, 8 mM and 16 mM). MP-Fc were then mixed with carboxylated single-walled carbon nanotubes (SWCNT-COOH; 1 mg mL⁻¹ in water) in the presence of salt. Under these conditions, SWCNT-COOH adsorb onto the surface of MP-Fc. As a result, MP-Fc-SWCNT complexes are formed, an event that is presumably driven by van der Waals forces.^{16,17} When MP-Fc-SWCNTs were subsequently confined on the electrode surface using a magnet, it was observed that SWCNTs formed a web that wrapped the MPs and wired the beads between them and with the electrode surface (Fig. 1a and S1†).

When MP-Fc-SWCNT modified electrodes were studied by cyclic voltammetry (CV) in PBS, SWCNT wiring resulted in a shoulder around -0.2 V vs. Pt (Fig. 1b), which is attributed to the oxygen defects present at the ends of acid-treated SWCNTs.^{17,24} Additionally, MP-Fc generated a detectable pair of oxidation and reduction waves around 0.1–0.2 V vs. Pt that was never generated by unlabelled MPs. The peak height was proportional to the amount of Fc-COOH added to the conjugation reaction. In all cases, the peaks registered by SWCNT wiring were significantly higher than those generated by the

same MP-Fc directly placed onto the electrodes (*i.e.* with no SWCNT; Fig. S2†). Although MP M280 displayed a linear response over a wider Fc concentration range, measurement reproducibility was significantly better for T1 (Fig. 1c). Both MPs M280 and T1 had been used at a concentration of 5 mg mL⁻¹, which corresponds to 3–3.5 $\times 10^8$ MPs and 7.4–8.6 $\times 10^9$ μm^2 per mL for M280, but to 3.5–5.0 $\times 10^9$ MPs and 11–15 $\times 10^9$ μm^2 per mL for T1, respectively. Therefore, similar MP volumes involve 10 times more beads when using T1 but total areas of the same order of magnitude in both cases. Our results might indicate that using MPs of smaller sizes provides better SWCNT packing, more homogeneous coverage of the beads by SWCNTs and/or enhanced surface wiring, which translates into higher reproducibility of their surface sensing.

T1 MPs modified with 16 mM of Fc (MP-Fc₁₆), which generated the highest and most reproducible peaks, were selected for subsequent experiments. Noteworthy, when the SWCNT-MP-Fc₁₆ composite was allowed to dry on the electrode, the height of the peaks attributed to Fc increased (Fig. 2a). This effect was studied further by serially diluting MP-Fc₁₆, which were combined with the appropriate amount of unlabelled MPs to keep constant the final quantity of beads. After mixing with SWCNTs and confining the MP-Fc-MP-SWCNT complexes onto the electrode surface, differential pulse voltammetry (DPV) was performed in PBS straightforward or after composite drying for 20 min at room temperature. As it can be observed in Fig. 2a and b, higher and narrower peaks were obtained after composite drying of all the concentrations of MP-Fc₁₆. Under these conditions, detection of just 0.5 μL of MP-Fc₁₆ was feasible,

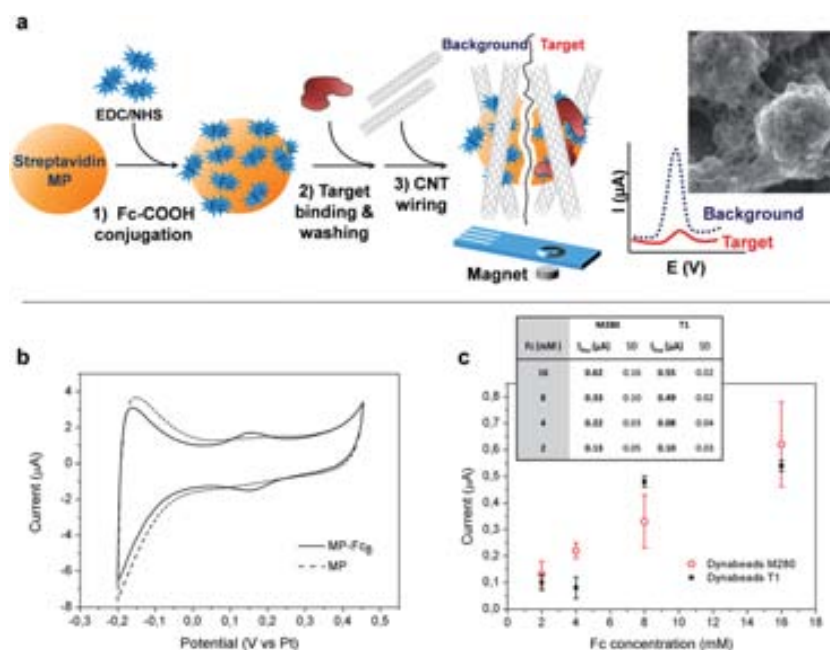


Fig. 1 (a) Schematic representation of MP modification and assay performance. (1) Streptavidin-MP are modified with Fc by EDC/NHS chemistry. (2) MP-Fc are incubated with Tween or biotinylated antibody and are washed to remove poorly adsorbed molecules. (3) SWCNTs are mixed and electrochemical detection is performed by SWCNT wiring to the electrode surface. The Scanning Electron Microscopy (SEM) image shows that magnetically entrapped SWCNTs form a web that physically wraps T1 MPs, connecting the beads between them and with the electrode surface. (b) CV generated in PBS by SWCNT wiring of either MP-Fc or unlabelled MPs. (c) Plot of peak height obtained in the CV versus Fc concentration in the modification reaction of the two types of MPs tested.

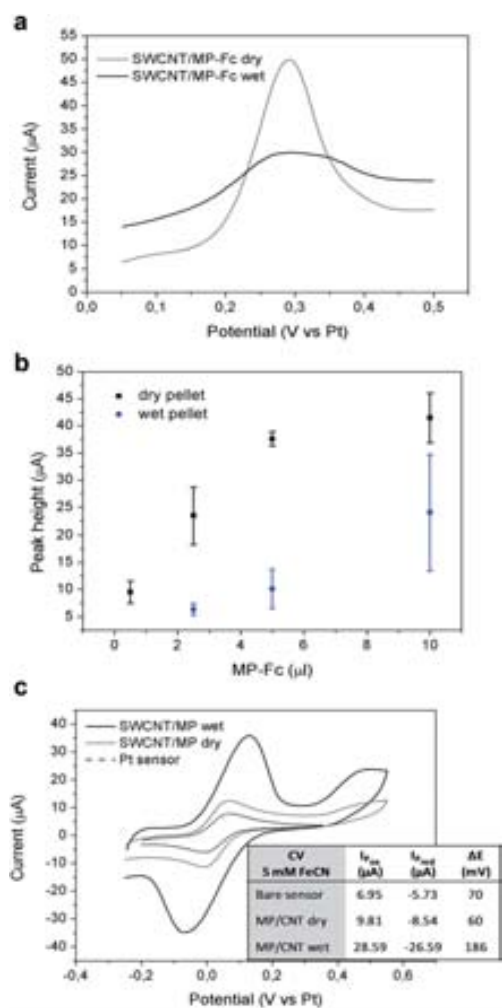


Fig. 2 (a) DPV obtained in PBS after electrode modification with the MP-Fc₁₆-SWCNT composite either wet or dried. (b) Plot of the peak heights obtained for dry and wet composites (MP-SWCNT) containing increasing amounts of MP-Fc₁₆ (in all cases mixed with the appropriate numbers of unlabeled MPs to include the same total quantity of MP + MP-Fc₁₆). (c) CV registered in 5 mM ferrocyanide at Pt electrodes either bare or modified with dry and wet MP-SWCNT composites.

while in the wet composite amounts of MP-Fc₁₆ below 2.5 μ L did not generate detectable peaks. Besides, signal reproducibility was better after composite drying.

In contrast, when CV was performed in ferrocyanide (instead of PBS) for the different MP-MP-Fc₁₆-SWCNT mixtures, the peaks obtained for the wet composite were significantly higher than those obtained for the dry one (Fig. 2c). This indicated that the active area of the electrode was bigger for wet MP-SWCNT composites. At the same time, the oxidation to reduction peak separation was notably larger for wet composites, which denotes slower and less efficient electron transfer kinetics. Hence, compared to bare electrodes, the devices modified with wet MP-SWCNT composites showed enlarged active areas, but the chips modified with dry MP-SWCNT mixtures displayed active areas only slightly larger than unmodified electrodes but better electrochemical performance. MP-SWCNT modified electrodes were additionally characterized by electrochemical

impedance spectroscopy (EIS) in ferrocyanide (Fig. S3†). While bare electrodes presented charge transfer resistance values (R_{ct}) of about 1.4 k Ω , the electrodes modified with MPs (but not SWCNTs) displayed increased R_{ct} (12 k Ω), which is indicative of decreased electron transfer. In the case of the sensors modified with MP-SWCNTs, the R_{ct} value decreased due to the enlarged area, electrocatalytic properties and enhanced electron transfer provided by SWCNTs.

The different behavior of wet and dry MP-SWCNT composites was also apparent by EIS. The R_{ct} value of the dry composites was lower than that of the wet composites (0.3 k Ω versus 0.69 k Ω on average), which was consistent with the results obtained by CV in ferrocyanide. The different behavior of wet/dry MP-SWCNT electrodes is compatible with a more scattered multilayer conformation of the wet composite, in opposition to a compact structure of the dry mixtures.²⁵ In the first case, there would be more free spaces between the SWCNTs and a higher proportion of their surfaces exposed to the electrolyte solution, which allows the building up of thicker diffusion layers. This implies a higher effective area, but worse electrical contact between tubes, MPs and electrode surfaces. On the other hand, when the composite is allowed to dry it presumably forms a compact structure with tightly packed SWCNTs that display heavily overlapping diffusion layers, which results in effective planar diffusion to the electrode surface.²⁵ Besides, in the dry composite the MP surface is better wired by the SWCNTs, which can absorb to a higher extent over the drying process.

Next, we studied whether SWCNT wiring of MP-Fc₁₆ could be exploited for the fast and simple detection of non-electroactive analytes. It was hypothesized that analyte binding onto MP-Fc₁₆ would induce physical shielding of a proportion of the Fc labels and/or affect SWCNT wiring efficiency. As the first proof of concept, we targeted detection of Tween 20, a non-ionic detergent which is extensively used as an emulsifier in food processing, for prevention of non-specific adsorption in bioassay development, for protein stabilization, or for membrane solubilization.²⁶ It is well known that Tween 20, as other surfactants, attaches non-specifically to a variety of surfaces/materials.^{27,28}

The measurements for detergent detection were performed in wet MP-SWCNT composites. With this aim, 5 μ L MP-Fc₁₆ and 5 μ L MPs were combined and, following washing, were incubated in 50 μ L of PBS with different amounts of Tween for 2 min. After washing two times with PBS, the MP-MP-Fc₁₆ were mixed with SWCNTs and were magnetically entrapped on the sensor. DPV was performed immediately in PBS in order to measure the height of the peaks produced by the Fc labels. As shown in Fig. 3a and b, incubation in the presence of Tween resulted in a drop in peak height. The higher the proportion of Tween present during the incubation, the lower was the peak generated. This suggested that adsorbed Tween sheltered part of the labels that were conjugated on the surface of the MP-Fc₁₆ and contributed to the reduction of the amount of Fc units measured by CNT wiring. On top of this, the presence of a surfactant led to a decrease of background current, which resulted in scan shift towards lower initial current values (Fig. 3a). Since the starting current was proportional to the

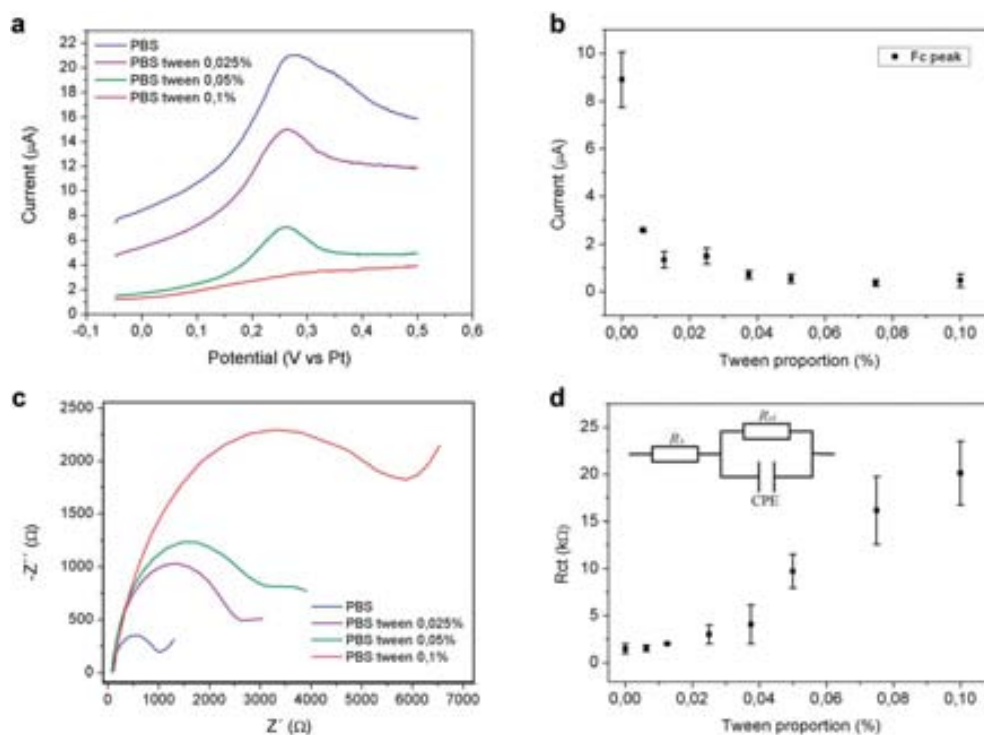


Fig. 3 (a) DPV performed on wet MP-Fc₁₆-SWCNT in PBS after incubation of MP-Fc₁₆ with increasing concentrations of Tween and washing with PBS. (b) Plot of the Fc peak height versus Tween proportion. (c) Nyquist plots obtained for MP-Fc₁₆-SWCNT in ferrocyanide 5 mM after MP-Fc₁₆ incubation with different concentrations of Tween. (d) Plot of the R_{ct} versus Tween concentration and image of the equivalent Randles circuit used for EIS fitting.

SWCNT wiring efficiency,^{16,17} these results indicated that Tween bound on the surface interfered also with SWCNT wiring onto the MPs.

Detergent binding was also observable by EIS (Fig. 3c and d). In this case, incubation with Tween caused a significant increase in R_{ct} (Fig. 3c and d), which grew proportionally to the concentration of the detergent. This was indicative of deterioration of the charge transfer rate. These data were consistent with the results obtained by DPV and suggested that the wiring of the SWCNTs to the particles was less effective in the presence of Tween. Furthermore, the results confirmed that binding of a target analyte onto MP-Fc₁₆ could be monitored electrochemically by SWCNT wiring.

Finally, we studied whether the sheltering effect that had been observed for detergent detection, which occurred in a completely random way over the whole surface of MP-Fc₁₆, was applicable to localized/directed protein affinity-biosensing. In these experiments, the well-known streptavidin-biotin interaction was used as a model and the measurements were performed after the MP-SWCNT composite was allowed to dry. The efficient biotin-streptavidin recognition has been studied many times in the literature and is considered as the strongest non-covalent protein ligand interaction known in nature, thanks to the establishment of, among others, an extensive hydrogen-bonding network.^{29–32}

For protein biosensing, several mixtures of streptavidin-coated unlabelled MPs and MP-Fc₁₆ were prepared, so that different amounts of MP-Fc₁₆ were present but the final amount

of beads was kept constant. MP-Fc₁₆ were then incubated for 15 min with increasing concentrations of a biotinylated antibody (0–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in the presence of a molar excess of unrelated proteins (0.1% BSA, equivalent to 1 mg mL^{-1}). MP-Fc₁₆ were then washed once with PBS 0.05% Tween and twice with PBS, which was followed by SWCNT magnetic co-trapment onto an electrode and MP-SWCNT composite drying before the electrochemical measurement.

As summarized in Fig. 4a, in the absence of antibody the peak height depended on the amount of MP-Fc₁₆ in the mixtures. When only MP-Fc₁₆ were used, the shielding effect due to antibody binding was limited. For example, incubation with 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of antibody induced a decrease in the signal of less than 5 μA , corresponding to around 15% compared to the MP-Fc₁₆ incubated with BSA in the absence of antibody. This was attributed to the fact that Fc labels had been randomly conjugated onto the whole MP surface, generating a very high background signal, but only a proportion of them may have been incorporated close to streptavidin biotin-binding sites and could be physically sheltered upon antibody binding. However, as the proportion of MP-Fc₁₆ decreased in the mixture, the shielding effect improved proportionally. For instance, incubation with 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of antibodies generated decreases in the signal of 27% and 90% for mixtures containing 50% and 25% of MP-Fc₁₆, respectively (Fig. 4a).

Fig. 4b illustrates the results obtained after incubating a mixture of 25% MP-Fc₁₆ and 75% MPs with 0, 2, 4, 8 and 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of biotinylated antibodies. As before, the incubation was

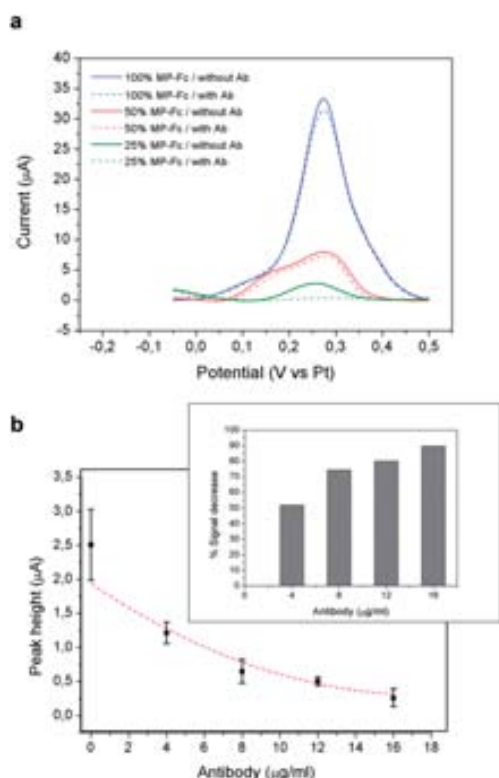


Fig. 4 (a) DPV obtained for different mixtures of MP-MP-Fc₁₆ after incubation with 1 mg mL⁻¹ of BSA and with/without 16 μg mL⁻¹ of biotinylated antibody. Antibody binding induces sheltering of part of the Fc, an effect that is inversely proportional to the amount of MP-Fc₁₆ in the mixture. (b) Calibration experiment performed with 25% MP-Fc₁₆ for different concentrations of the antibody.

performed in the presence of an excess of BSA (1 mg mL⁻¹) in order to distinguish between Fc sheltering due to protein non-specific adsorption and specific affinity binding. As it can be observed, the peak height decreases as the concentration of antibody increases, denoting higher levels of surface shielding. It is unclear whether other factors, such as MP-Fc₁₆ aggregation due to multiple antibody cross-binding per target unit, could also play a role. The limit of detection (LOD, 3σ) was around 4 μg mL⁻¹ antibody, which generated a decrease in the signal of about 50% compared to the negative controls. As already discussed, such a high LOD was attributed to the high assay background noise, presumably caused by the number of Fc units that have been incorporated beyond the MP streptavidin biotin-binding sites. According to these results, future improvement of the assay performance and sensitivity could strongly depend on the efficient and directed incorporation of electroactive labels to the ligands of interest (instead of the whole MPs).

Conclusions

Magnetic entrapment of SWCNTs using MPs results in electrical wiring between the surfaces of the MP and the electrode. Here, we show the usefulness of SWCNT wiring for detection of non-electroactive molecular targets. For this purpose, we have

modified MPs of different sizes with an electroactive label, Fc, and we have improved the conjugation and handling conditions for electrochemical monitoring of the Fc labels by SWCNT wiring. As a proof of concept, detection of two different non-electroactive targets, Tween 20 and a biotinylated antibody, has been carried out. While detergent binding occurs randomly onto the surface of the whole MP-Fc, affinity capture of the antibody occurs specifically at streptavidin biotin-binding sites. In both cases, however, attachment of the target onto the MP surface correlates with partial shielding/sheltering of the electroactive labels. This event translates into a decrease of the electrochemical signal at the SWCNT-MP-Fc modified electrode.

Although the LODs reported here are high, we propose that additional assay optimization could improve its performance significantly. For instance, accurate selection of the electroactive label and/or the conjugation strategy used, as well as directed incorporation of the label into the bioreceptor molecules (instead of the whole MP) would generate more sensitive assays.

Notes and references

- 1 S. Martić, M. Labib, P. O. Shipman and H.-B. Kraatz, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 7264–7290.
- 2 B. Seiwert and U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 181–200.
- 3 Q. Zhu, Y. Chai, R. Yuan, Y. Zhuo, J. Han, Y. Li and N. Liao, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **43**, 440–445.
- 4 P. Qi, D. Zhang, Y. Wan and D. Lv, *Talanta*, 2014, **118**, 333–338.
- 5 S. M. Khor, G. Liu, C. Fairman, S. G. Iyengar and J. J. Gooding, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2038–2044.
- 6 K. Kerman and H.-B. Kraatz, *Analyst*, 2009, **134**, 2400–2404.
- 7 W. Shi and Z. Ma, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 3068–3071.
- 8 J.-D. Qiu, R.-P. Liang, R. Wang, L.-X. Fan, Y.-W. Chen and X.-H. Xia, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 852–857.
- 9 R. Hirsch, E. Katz and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12053–12054.
- 10 I. Y. Goon, L. M. H. Lai, M. Lim, R. Amal and J. J. Gooding, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 8821–8823.
- 11 L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **622**, 11–47.
- 12 J. J. Gooding, *Electrochim. Acta*, 2005, **50**, 3049–3060.
- 13 M. Trojanowicz, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 480–489.
- 14 M. Zhu and G. Diao, *Nanoscale*, 2011, **3**, 2748–2767.
- 15 E. Baldrich and F. X. Muñoz, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9244–9250.
- 16 E. Baldrich, R. Gómez, G. Gabriel and F. X. Muñoz, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 1876–1882.
- 17 R. Olivé-Monllau, F. X. Muñoz-Pascual and E. Baldrich, *Sens. Actuators, B*, 2013, **185**, 685–693.
- 18 S. Qu, J. Wang, J. Kong, P. Yang and G. Chen, *Talanta*, 2007, 1096–1102.
- 19 Z. Liu, J. Wang, D. Xie and G. Chen, *Small*, 2008, **4**, 462–466.

- 20 S. Qu, F. Huang, G. Chen, S. Yu and J. Kong, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 2812–2816.
- 21 Y. Pang, G.-m. Zeng, L. Tang, Y. Zhang, Z. Li and L.-j. Chen, *J. Cent. South Univ. Technol.*, 2011, **18**, 1849–1856.
- 22 B. Pérez-López and A. Merkoçi, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, **21**, 255–260.
- 23 F. Li, L. Mei, Y. Li, K. Zhao, H. Chen, P. Wu, Y. Hu and S. Cao, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 4253–4256.
- 24 D. Salinas-Torres, F. Huerta, F. Montilla and E. Morallón, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 2464–2470.
- 25 A. F. Holloway, D. A. Craven, L. Xiao, J. D. Campo and G. G. Wildgoose, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 13729–13738.
- 26 B. A. Kerwin, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 2924–2935.
- 27 K. Mohammad and A. Esen, *J. Immunol. Methods*, 1989, **117**, 141–145.
- 28 M. Steinitz, *Anal. Biochem.*, 2000, **282**, 232–238.
- 29 M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello and J. B. Edel, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7063–7067.
- 30 S. Guo, C. Ray, A. Kirkpatrick, N. Lad and B. B. Akhremitchev, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 3964–3976.
- 31 V. Tsouti, C. Boutopoulos, P. Andreakou, M. Ioannou, I. Zergioti, D. Goustouridis, D. Kafetzopoulos, D. Tsoukalas, P. Normand and S. Chatzandroulis, *Microelectron. Eng.*, 2009, **86**, 1495–1498.
- 32 Y. J. Yuan, Y. Zhao and W. L. Xu, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **680**, 59–64.

A.2.1.3. Electrochemical detection of dopamine using streptavidin-coated magnetic particles and carbon nanotube wiring



Electrochemical detection of dopamine using streptavidin-coated magnetic particles and carbon nanotube wiring



Zorione Herrasti^a, Fernando Martínez^a, Eva Baldrich^{b,c,*}

^a IK4-Ikerlan Technological Research Centre, 20500 Mondragón, Spain

^b Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^c Diagnostic Nanotools for Fast Assay and Biosensor Development, Molecular Biology and Biochemistry Research Center for Nanomedicine (Cibbim-Nanomedicine), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2014

Received in revised form 14 May 2014

Accepted 3 July 2014

Available online 12 July 2014

Keywords:

Carbon nanotubes (CNT)

Magnetic particles (MP)

CNT wiring

Dopamine electrochemical detection

Urine real samples

ABSTRACT

Magnetic particles (MP) and carbon nanotubes (CNT) have been extensively exploited in biosensor development. It has been recently suggested that combining MP binding of electroactive molecules with CNT wiring of the MP surface could provide novel sensing formats. Here, we demonstrate the validity of this approach using as a model dopamine (DA).

As we show, DA can be electrostatically bound and concentrated using commercially available streptavidin-coated MP. Electrochemical detection of MP-bound DA is then accomplished by CNT wiring using cheap and disposable screen printed electrodes of different sizes and materials. The parameters potentially affecting DA binding, CNT wiring and electrochemical detection have been studied and optimized. The resulting assay takes 45 min, displays LOD of 2 nM DA in saline solution, is unaffected by ascorbic acid and uric acid, and can be operated in diluted urine human samples.

Our results confirm that CNT wiring allows efficient detection of electroactive species after MP binding and is compatible with the study of complex real samples.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dopamine (DA) is a catecholamine that acts as neurotransmitter and chemical messenger. Abnormal production of DA in the brain is associated with a number of neurological and neurodegenerative disorders, such as schizophrenia and Parkinson's disease [1]. Besides, increased DA levels in urine, blood and/or saliva can be indicative of hormonal malfunction, drugs' intake or sustained stress, and might confirm the diagnosis of rare adrenal tumors such as pheochromocytoma and neuroblastoma [2,3]. DA is found in urine of healthy individuals at high nM to low μ M concentrations, with values being directly affected by a number of external factors (e.g. intake of certain foods, drinks and drugs, dehydration level, and fatigue) [4,5].

DA detection used to be carried out by radioenzymatic and immunological techniques [6]. These have been replaced over time

by more sensitive and selective chromatographic methods, including high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis [6]. Such approaches, however, depend on bulky and expensive equipment that has to be handled by specialized staff. Electrochemical sensors have been proposed as a cheaper and simpler alternative for detection of DA, which is electroactive [7–9]. The main drawback for DA electrochemical detection is that it coexists in real samples with various interfering compounds, like uric acid (UA) and ascorbic acid (AA), that are present at significantly higher concentrations (100–500 μ M), are also electroactive, and are oxidized at potentials that are very close to the oxidation potential of DA at most electrode materials. Accordingly, DA electrochemical sensors cluster within two groups: those able to detect UA, AA and DA simultaneously [10–12] and those that detect preferentially DA by getting rid of UA and AA [13–16].

The selective electrochemical detection of DA in the presence of UA and AA is mostly founded on their different pK_a values and electrostatic behavior ($pK_a = 8.87, 4.10$ and 5.40 , respectively), because at neutral pH UA and AA are negatively charged but DA is positive. Therefore, by charging negatively the electrode surface, electrostatic attraction of DA but repulsion of negatively charged interferences are promoted [9,17–19]. Many strategies for electrode modification have been developed with this purpose, including the

* Corresponding author at: Diagnostic Nanotools for Fast Assay and Biosensor Development (DINA), Molecular Biology and Biochemistry Research Center for Nanomedicine (Cibbim-Nanomedicine), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934 893 000.
E-mail address: eva.baldrich@vhir.org (E. Baldrich).

Table 1
Summary of sensors described by other authors for DA detection in urine samples. For each example, assay linear range and LOD are summarized, as well as the lowest concentration of DA spiked in urine that was reportedly detected and if endogenous DA was distinguished. NS stands for not stated. GCE stands for glassy carbon electrode; PVP stands for polyvinylpyrrolidone; p-TA stands for 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole; PEDOT stands for poly(3,4-ethylene dioxythiophene); S- β -CD stands for sulphated b-cyclodextrin; SFR stands for safranin.

Electrode/modifier	Linear range (μM)	LOD (μM)	Detection of endogenous DA	Lowest concentration of spiked DA detected/sample matrix	Ref
Graphene/Pd-Pt nanoparticles	4–200	0.04	No	10 μM DA/urine diluted 1:100	[12]
GCE/iron-doped natrolite zeolite and MWCNT	7.35–833	1.05	No	20 μM DA/urine diluted 1:10	[33]
Water soluble sulfonated graphene	0.2–20	0.02	NS	NS	[9]
GCE/PVP and graphene	0.0005–1130	0.0002	No	200 μM DA/undiluted urine	[34]
Au disk electrode/gold nanodendrite and anionic SAM	0.1–5	0.02	No	0.3 μM DA/undiluted urine	[35]
GCE/porphyrin-functionalized graphene	0.1–1	0.01	No	1 μM DA/urine diluted 1:100	[17]
GCE/sol-gel thin-film mesoporous silica and MWCNT	0.133–4.64	0.014	No	0.049 μM DA/NS	[36]
GCE/p-TA film and gold nanoclusters	0.6–340	0.05	No	10 μM DA/NS	[37]
Basal plane pyrolytic graphite/naphthoquinone and MWCNT	0.01–0.07	0.003	No	50 nM DA/urine diluted 1:1000	[38]
GCE/graphene, cyclodextrin and gold nanoparticles	0.5–4	0.15	No	10 μM DA/undiluted urine	[39]
GCE/Polydopamine-nanogold composite	1–80	0.08	No	10 μM DA/NS	[40]
SnO ₂ nanoparticle, MWCNT, carbon paste	0.3–50	0.03	No	NS/urine diluted 1:50	[41]
Au disk electrode/PEDOT and S- β -CD film		0.18	No	1 μM DA/urine diluted 1:50	[42]
Pretreated pencil graphite electrode	0.3–150	0.033	Yes (1.80 μM DA)	4.97 μM DA/urine diluted 1:2	[43]
AuNPs@SiO ₂ core-shell imprinted composite	0.048–50	0.02	Yes (0.3278 μM DA)	0.2 μM DA/urine diluted 1:5	[44]
GCE/Au nanoparticle, DNA and SFR composite	0.008–1.1	0.0002	Yes (0.01–0.02 μM DA)	0.5 μM DA/urine diluted 1:200	[45]
GCE/hexacyanoferrate micro stars and MWCNT	3–137	NS	No	3 μM DA/urine diluted 1:50	[46]
Au-SPE (1.6 mm)/MP SWCNT wiring (2.8 μm)	0.78–50	0.120	No	10 μM /urine diluted 1:10	[14]
C-SPE (4 mm)/SWCNT wiring of MP (1 μm)	0.1–5	0.002	Yes (0.44–0.77 μM)	0.1 μM /urine diluted 1:10	This work

incorporation of ion exchange membranes, Nafion, polymers, self assembled monolayers of charged thiols, metal nanoparticles and carbon-based materials [9]. Nevertheless, few examples of electrochemical sensors have been successfully applied to DA detection in urine real samples and most of them displayed LODs too high to detect endogenous DA (Table 1).

In a previous work, we used immunofunctionalized magnetic beads (2.8 μm φ) for DA immunocapture and concentration and we demonstrated that DA electrochemical detection at the MP surface could be significantly improved by carbon nanotube (CNT) wiring [14]. In the current work, streptavidin-coated magnetic particles (MPs, 1 μm φ), which display $pI=5.0$ and are negatively charged at neutral pH, are used instead for DA binding and recovery. As we show, using smaller beads and selecting the optimal electrode size and material provide enhanced CNT wiring and DA detection. After optimization of assay parameters and detection conditions, DA could be detected in less than 45 min with a LOD of 2 nM, compared to assay times of more than 2 h and LOD above 120 nM in the previous work [14]. To demonstrate the applicability of the proposed method to the study of complex matrices, DA is finally detected in human urine with better performance than most of the sensors previously reported for DA determination in this type of sample (Table 1).

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents and biocomponents

Phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M phosphate, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.4), dopamine hydrochloride (DA), L-ascorbic acid (AA), uric acid (UA), bovine serum albumin (BSA), Tween 20, potassium ferricyanide ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$), and carboxylated single-walled carbon nanotubes (SWCNT-COOH; >90.0% C, 4–5 nm

φ , 0.5–1.5 μm length) were from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Streptavidin-coated magnetic particles (MP; Dynabeads T1 and M280, 1 and 2.8 μm φ) were from Life Technologies.

SWCNT-COOH were resuspended in deionized water (1 mg mL⁻¹) and were sonicated in an S15H Elmasonic sonicator at 37 kHz for 1.5 h. Water in the equipment tank was refreshed every 15 min to prevent heating.

2.2. Electrodes

Six types of screen printed electrodes (SPE; DropSens; Oviedo, Spain) were compared, which displayed working electrodes (WE) made of gold (Au-SPE, Refs. C223BT and 220BT), platinum (Pt-SPE, Ref. 550), carbon (C-SPE, Ref. 110), carbon modified with MWCNT (MWCNT-SPE, Ref. 110CNT), and carbon modified with gold nanoparticles (AuNP-SPE, Ref. 110-GNP). Except for C223BT (1.6 mm φ), the chips include a 4 mm diameter WE, a silver pseudoreference and a counter electrode made of platinum (Pt-SPE), gold (Au-SPE) or carbon (C-SPE, MWCNT-SPE and AuNP-SPE).

Electrochemical measurements were carried out using an Autolab PGSTAT 128N (Eco-Chemie, The Netherlands). Before use, C-SPE were activated at 1.4 V for 100 s. Au-SPE, were activated by cycling 15 times between 0 V and 1.4 V in 0.05 M H₂SO₄ (scan rate 100 mV s⁻¹). Pt-SPE were activated with series of pulses, alternating between -1.4 V, 0 V and 1.4 V during 5 s each. MWCNT-SPE and AuNP-SPE were used directly. All sensors were characterized in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ by cyclic voltammetry (CV).

2.3. DA binding and electrochemical detection by SWCNT wiring

Unless otherwise stated, incubations and washes were carried out protected from light, under rotation at 10 rpm, and at room temperature.

DA was serially diluted in 100 μL of PBS, BSA 0.1%, tween 0.02% (PBS-BT), and each concentration was incubated with 12 μL of MP (5 mg mL^{-1}) for 30 min. After incubation, MPs were washed twice with 500 μL of PBS, tween 0.05% (PBS-T) for 5 min each, were rinsed with 100 μL of PBS, and were resuspended in 10 μL of PBS.

For MP/SWCNT magnetic coentrapment, MPs were pipetted for 20 s with 4 μL of three-times concentrated PBS ($3 \times$ PBS) and 5 μL of SWCNT-COOH [20]. Magnetic confinement of MP/SWCNT complexes was promoted by placing a neodymium magnet (4 mm φ , Supermagnete) under the WE (Fig. 1a).

DA was detected by CV from 0 V to 0.45 V (50 mV s^{-1} scan rate) in citrate phosphate buffer, pH 4.2.

The assay lower limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as the average of the blanks plus three and 10 times their standard deviation (SD), respectively. The assay variability was calculated in terms of variation coefficient ($\%CV = (SD/\text{mean}) \times 100$). Each experiment was performed at least three times.

2.4. DA measurements in real urine samples

Urine real samples obtained from one of the authors (pH 6.5–7.0) were collected in different days, always under fasting condition. Urine samples were inoculated with increasing concentrations of DA, were diluted with PBS tween 0.02%, and were assayed as detailed above. Samples were analyzed in parallel by HPLC at a reference laboratory (Osarten K.E.; Mondragon, Spain) in order to determine the real concentration of DA.

3. Results and discussion

3.1. DA binding and concentration using streptavidin-coated MP

Attempts to promote selective electrochemical detection of DA and decrease interference by coexisting electroactive molecules, such as AA and UA, are often based on the utilization of negatively charged electrode surfaces [10,13,21,22]. Here, we propose the alternative utilization of streptavidin-coated Dynabeads that, according to the provider's description, are negatively charged at neutral pH ($pI = 5.0$). In this way, after rotation with the sample and DA binding, MP are concentrated and washed using a magnet to remove other sample components. To improve the sensor response further, MP are then mixed with SWCNT. It has been shown that SWCNT adsorb onto the surface of MP. The MP/SWCNT complexes formed are then confined magnetically onto an electrode, and electrochemical detection is performed by SWCNT wiring [14]. For this experiments, Au-SPE that displayed 1.6 mm φ WE were used as reported previously [14].

3.1.1. Effect of MP size on DA detection efficiency

The detection of DA was attempted in parallel on two types of MP, M280 and T1, which had similar surface chemistry but different size (2.8 and 1 μm φ ; Fig. 1b–d).

For DA binding, MPs were rotated with 1 mL of DA solution for 2 h, were washed twice with 800 μL of PBS-T for 5 min under rotation and were rinsed with 100 μL of PBS. The electrochemical measurements were performed by SWCNT wiring (Fig. 1a). For this, MPs were mixed with SWCNT in the presence of salts, which induces transient destabilization of the SWCNT and adsorption onto the MP surface [20], followed by magnetic entrapment of the MP/SWCNT complexes onto the 1.6 mm φ WE of the Au-SPE (Fig. 1d, e). Upon modification with MP/SWCNTs, the Au-SPE displayed in the CV higher background currents than bare Au-SPEs, which was caused by the increase in WE efficient area due to CNT incorporation. SWCNT wiring resulted also in a shoulder around 0 V

vs. Ag (Fig. 2a), which is attributed to oxygen defects at the ends of acid-treated CNT [14].

The observation of an oxidation peak around 0.2 V vs. Ag after incubation with DA, but never in its absence, suggested that DA was being bound and concentrated by the MP. A certain level of peak shift was observed between independent measurements. This could be caused by the use of an Ag pseudoreference electrode or by the different compactness of the MP/SWCNT composite, and thus SWCNT behavior, under the different experimental conditions. SWCNT wiring was more effective for smaller MPs (Fig. 2a). For instance, the peak heights registered for DA were more reproducible and 40–60% higher at T1 than at M280 MP (1.46/1.49 μA and 0.66/0.84 μA for DA 50/100 μM bound by T1 and M280, respectively). The peak-to-peak separation (ΔE_{pp}) was also smaller for T1 (10.01 mV compared to 95.67 mV for M280). It has been previously suggested that electrochemistry at CNT-electrodes is conditioned by both planar diffusion of electroactive species towards the macro-electrode surface and diffusion within the porous CNT layer [23]. In this scenario, oxidation of molecules trapped in the spaces between the CNT, which can be understood as a thin layer cell of high electrode area, display smaller peak-to-peak separation than that expected for a process driven by semi-infinite planar diffusion at a naked macroelectrode (i.e.: 59 mV for a fast one-electron process) [23]. In the present case, MP-bound DA is physically entrapped within the SWCNT web and the small ΔE_{pp} values observed for some of the MP/SWCNT composites would be consistent with a thin-layer diffusion regime.

Both types of MP were used at similar concentration (5 mg mL^{-1}) which, considering the differences in size, involve 10 times more beads when using T1, but total areas of the same order of magnitude in both cases ($3.5\text{--}5 \times 10^9 \text{ MP mL}^{-1}$ and $11\text{--}15 \times 10^9 \mu\text{m}^2 \text{ mL}^{-1}$ for T1; $3\text{--}3.5 \times 10^8 \text{ MP mL}^{-1}$ and $7.4\text{--}8.6 \times 10^9 \mu\text{m}^2 \text{ mL}^{-1}$ for M280). It has been previously suggested that while bigger beads should be able to bind more tubes per MP, smaller MP would provide denser SWCNT packing during magnetic coentrapment of MP/SWCNT complexes [20]. Here, better packing of the SWCNT onto smaller MP presumably correlates with enhanced wiring between SWCNT, MP and the electrode surface and improved sensing of the MP surface. Accordingly, T1 MPs were used in the rest of experiments.

3.1.2. Effect of electrode size on SWCNT wiring efficiency

In order to study the effect of the WE size on SWCNT wiring efficiency, MPs were rotated with 100 μM DA and, after washing and SWCNT/MP coentrapment, electrochemical measurements were performed in parallel using Au-SPE with WE of 1.6 mm or 4 mm diameter. Both DA peak height and measurement reproducibility increased when using bigger electrodes (Fig. 2b). For example, while the variation coefficient ($\%CV$) was always below 15% for 4 mm WE, it was above 15% for 1.6 mm Au-SPE. Therefore, in the following measurements, 4 mm WE were used.

3.1.3. Incubation time optimization

The effect of incubation time in DA binding efficiency was next studied by rotating MP with DA (1 mL, 10 μM) for 15, 30 or 60 min. The results evidenced that 15-min incubations were insufficient, but incubations longer than 30 min did not generate higher peaks either (averaged peak heights 0.98, 1.31 and 1.17 μA for 15, 30 and 60 min incubations, respectively). This could indicate that surface saturation had been attained or that DA degradation and/or detachment occurred over time.

These data contrast with previous reports in which DA immunocapture using antibody-modified 2.8 μm MP improved with incubation time for up to 2 h [14] and might indicate that DA immunocapture protects DA to some extent from spontaneous oxidation. Here, DA binding by electrostatic attraction occurs faster

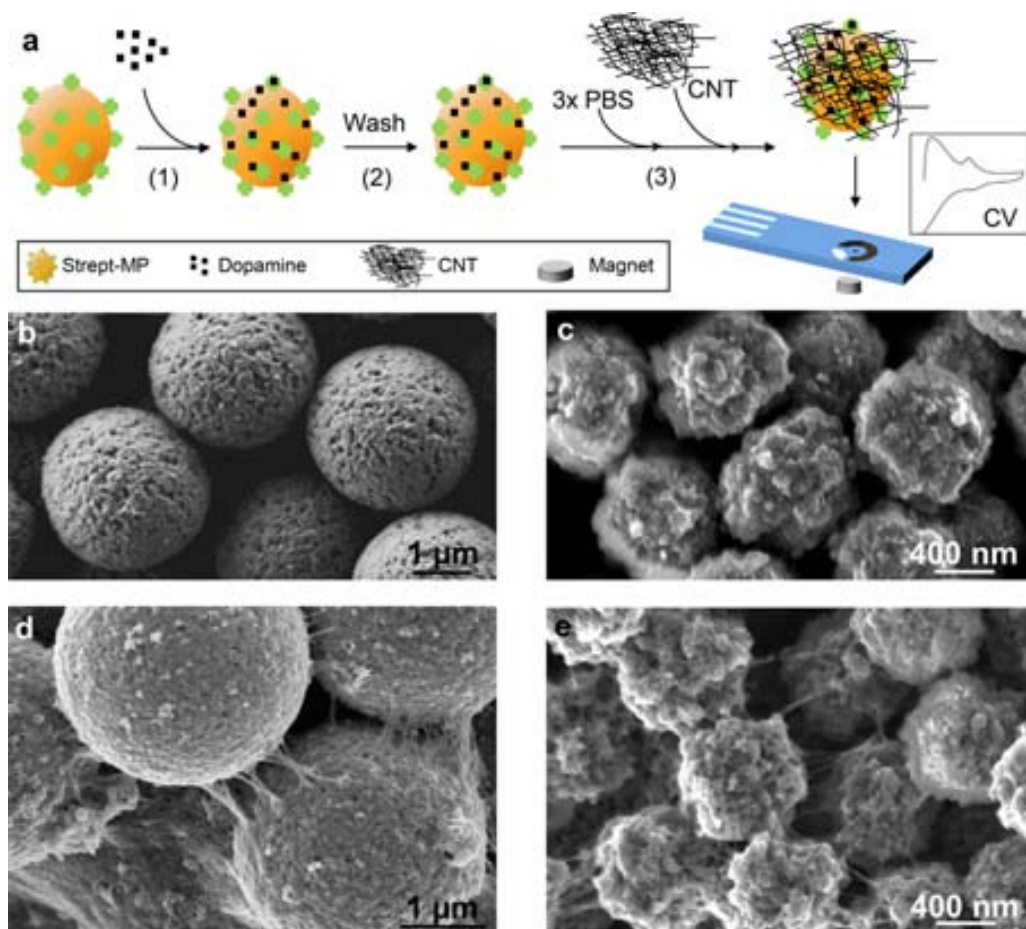


Fig. 1. Assay procedure. (a) Scheme of the assay procedure. (b, c) SEM images of as-received MP, 2.8 and 1 μm ϕ , respectively. (d, e) SEM images of magnetically entrapped MP/SWCNT complexes.

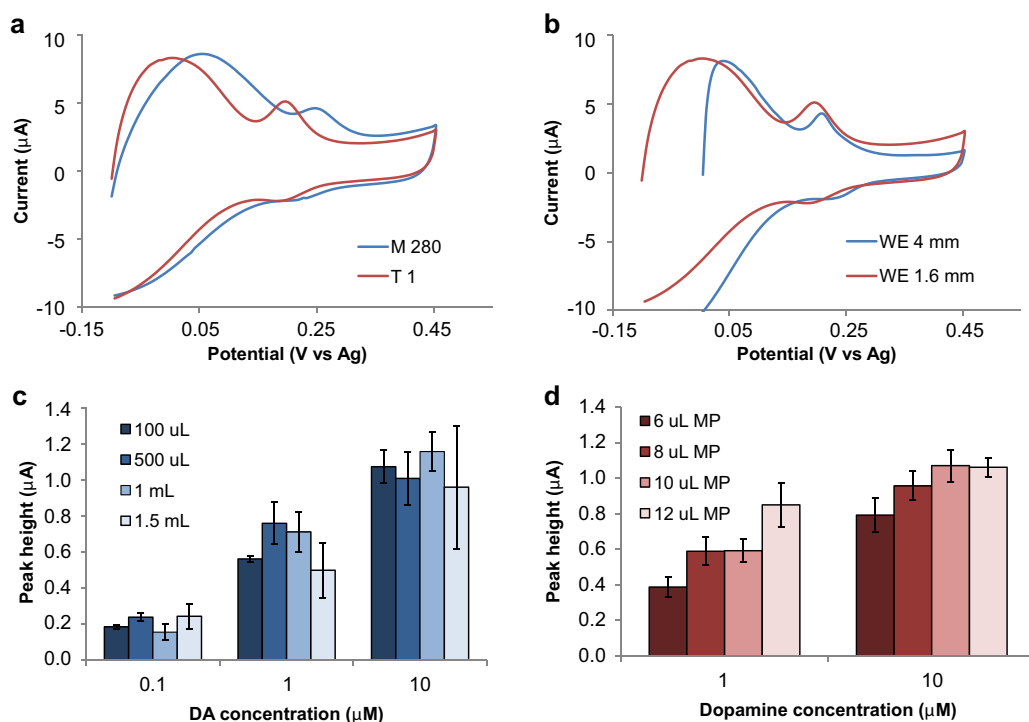


Fig. 2. Optimization of DA binding and CV electrochemical detection using MP and SWCNT wiring. Detection of 100 μM DA using (a) MP of different size (1 and 2.8 μm ϕ) and (b) Au-SPE displaying WE of 1.6 and 4 mm diameters. (b, insert) Summary of the signals obtained after DA binding for 15, 30 and 60 min. (c, d) Detection of DA in increasing sample volumes (c) and using growing amounts of MP (d).

than immunocapture, which contributes to reduce binding time from 2 h to 30 min, but at cost of a less specific DA attachment.

3.1.4. Sample volume optimization

For the optimization of sample volume, MPs were incubated for 30 min with increasing volumes of DA (100 μL , 500 μL , 1 mL and 1.5 mL). The peak heights registered by CV were in all cases proportional to DA concentration (Fig. 2c). It was observed that binding ameliorated for DA 0.1 and 1 μM when sample volume increased from 100 μL to 500 μL , which was consistent with higher absolute numbers of target molecules available in bigger volumes, but remained unchanged or decreased for higher volumes. The trend was less clear for 10 μM of DA, at which MP surface saturation was presumably approached. Volumes above 100 μL , on the other hand, generated wider data dispersion. This was attributed to the fact that, for those volumes, higher levels of physical dispersion of the MP happened inside the tubes during rotation, which could affect negatively MP recovery [24]. In view of this, a sample volume of 100 μL , which displayed the lowest coefficient of variation (%CV < 9) for all the concentrations of DA tested, was selected as the optimal for subsequent experiments.

3.1.5. Effect of the amount of MP on DA binding efficiency

The last step of assay optimization was the determination of the optimal amount of MP in the incubations. DA binding was performed in parallel using increasing numbers of MP and the electrochemical detection was carried out by mixing proportional volumes of SWCNT. Volumes of MP above 12 μL were not tested in order to limit the assay cost and keep the diameter of the MP/SWCNT sediment within the dimensions of the WE, and volumes below 6 μL were avoided because they resulted in high levels of MP lost during the washing steps.

As it can be observed in Fig. 2d, the higher the amount of MPs in the incubation, the higher the peak obtained in the CV. This effect was more evident for lower concentrations of DA, for which the increase in MP load translated into significantly higher recovery rates. It was reasonable to expect that higher numbers of MP in solution would provide wider surface areas for efficient DA binding. On top of this, incubation with higher amounts of MP reportedly provides enhanced and more reproducible magnetic recapture of the MP (i.e.: along the washing steps and over SWCNT magnetic coentrapment) [24].

3.2. Selection of the working electrode material

The optimized assay was next detected using SPE of similar size and geometry but made of different materials. First, Pt-SPE, Au-SPE and C-SPE were compared. Fig. 3a shows the plots of the averaged oxidation peak heights obtained for increasing DA concentrations ($n = 3$, using different electrodes and MP/SWCNT mixtures). In these experiments, while C-SPE measured the highest oxidation peaks for all the concentrations of DA tested, the oxidation peaks measured in the Pt sensors were the lowest ones (Fig. 3a). On the other hand, Au-SPE registered not only lower peaks than C-SPE, but displayed also unacceptable variability between replicates.

SWCNT display carbon π orbitals perpendicular to the nanotube walls [25]. Consequently, they exhibit adhesion to other molecules, nanostructures and surfaces displaying π orbitals via π - π staking, which is driven by series of long-range and relatively weak interactions such as van der Waals forces. Hence, it is reasonable that SWCNT adsorb to a higher extent onto carbon surfaces which display delocalized π electrons too. In contrast, the interaction of Pt and Au metals with SWCNT is not very effective, which is in accordance with reports by other authors describing low affinity of Pt and Au nanoparticles for SWCNT [26].

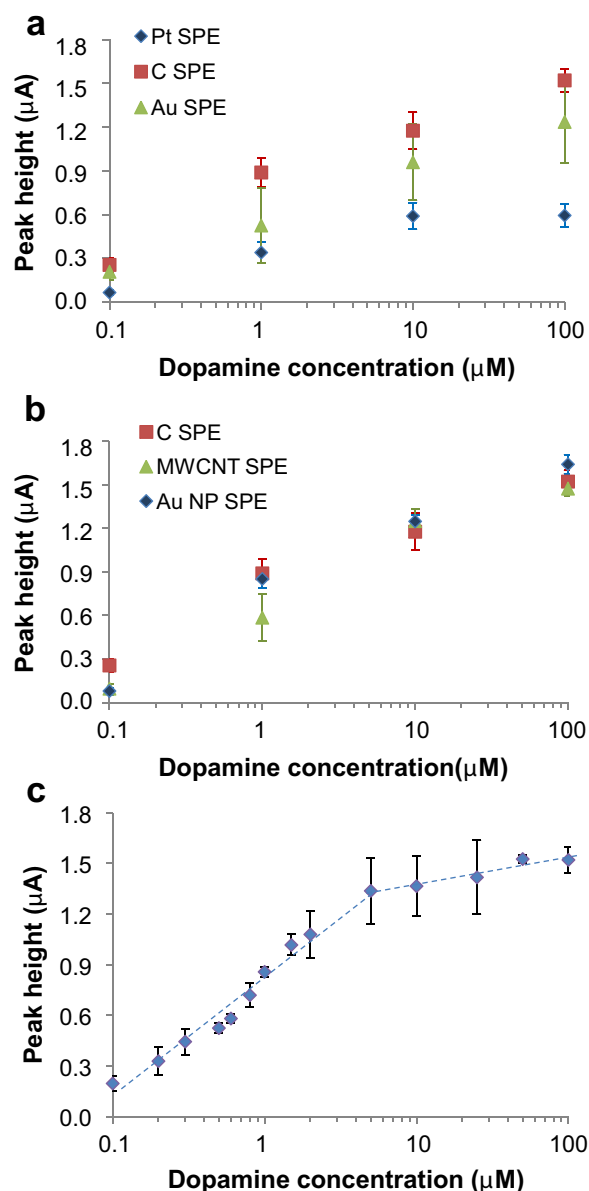


Fig. 3. CV detection of DA at different SPE. (a) Comparative performance of C-SPE, Au-SPE and Pt-SPE. (b) Comparative performance of C-SPE, MWCNT-SPE and AuNP-SPE. (c) Plot of oxidation peak current registered at C-SPE vs. DA concentration.

Once carbon was chosen as the best WE material for the present application, C-SPE modified by the provider with either AuNPs or MWCNTs were tested. In this case, the oxidation peaks measured for DA were similar for the three types of sensors (Fig. 3b). However, the averaged variation coefficients of MWCNT-SPE (%CV < 15) and AuNP-SPE (%CV < 18) were slightly higher than the numbers calculated for C-SPE (%CV < 11). As sensitivity and/or reproducibility did not improve when using SWCNT-SPE and AuNP-SPE, C-SPE were used in subsequent experiments due to their significantly lower cost.

Fig. 3c illustrates the results obtained for detection of 0.1–100 μM DA using the optimized magneto-immunoassay and C-SPE. The plot included two sections that involved linear response against the logarithm of DA concentration between 100 nM and 5 μM ($y = 0.3104\ln(x) + 0.8275$; $R^2 = 0.9741$) and between 5 and 100 μM ($y = 0.0693\ln(x) + 1.2162$; $R^2 = 0.9213$), the later with significantly higher signal variability. When operated in PBS-BT, the assay had LOD of 2 nM (3σ) and LOQ of 6.6 nM (3σ).

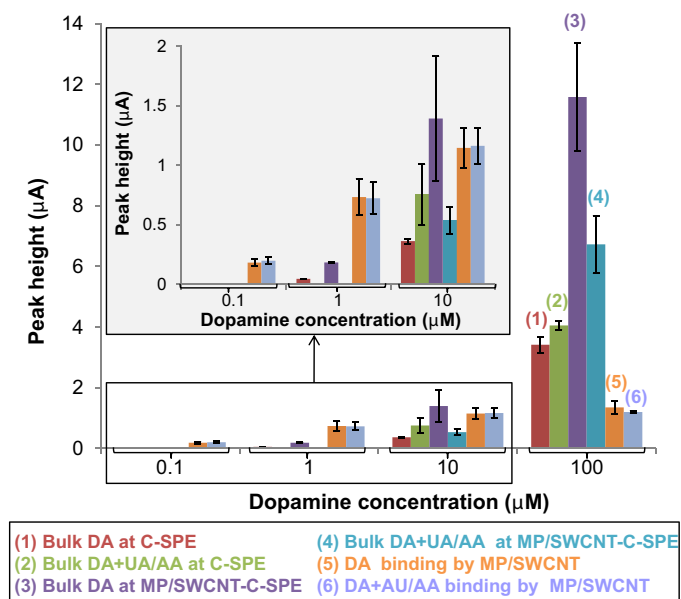


Fig. 4. CV detection of increasing concentrations of DA alone or in the presence of 100 μM of each UA and AA. For each DA concentration, results of six independent detection experiments are presented, which correspond from left to right to (1 and 2) detection of DA and DA/UA/AA in solution using bare C-SPE; (2 and 3) detection of DA and DA/UA/AA in solution using a C-SPE that had been previously modified with MP/SWCNT; and (5 and 6) MP binding and concentration of DA alone (5) or DA in the presence of UA/AA (6) followed by SWCNT addition and electrochemical detection at C-SPE by SWCNT wiring. (Insert) Partial amplification of the main graph.

3.3. DA electrochemical detection in the presence of interferents

3.3.1. DA detection in presence of AA and UA

Here, DA binding is based on electrostatic interaction at neutral pH between positively charged DA and negatively charged MP. It was expected that UA and AA would be repelled from the MP surface, preventing subsequent interference during electrochemical detection. In order to confirm this point, increasing concentrations of DA (0.1–100 μM in PBS-BT) were detected alone or in the presence of 100 μM UA and 100 μM AA. As a control experiment, the same mixtures of DA, UA and AA were detected straightforward (not submitted to MP binding) either at bare C-SPE or at C-SPE previously modified with SWCNT by the MP/SWCNT magnetic coentrainment procedure (Fig. 4).

When DA was detected in solution at a bare C-SPE, the peaks registered were shifted compared to those obtained for immunocaptured DA. This effect has been previously observed and is consistent with a change in electron transfer rate caused by DA immunocapture and/or confinement on surface [14]. The presence of interferents in solution resulted in increase of the oxidation peak

compared to DA alone. This was due to overlapping of the oxidation peaks of AA (0.17 V vs. Ag) and DA (0.10 V vs. Ag), which appeared as a single peak in the CV.

When C-SPE modified with MP/SWCNT were used instead, DA alone generated oxidation peaks approximately 3–4 times higher than those measured at bare C-SPE. This result confirmed that SWCNT incorporation provided enlarged electrode active area, electrocatalytic activity for DA and a certain level of DA preconcentration by electrostatic attraction towards the negatively charged SWCNT [14]. Simultaneously, the oxidation peak of AA was undetectable but UA, which is also negatively charged at pH 7.0, was measured. This presumably indicates that the AA oxidation peak overlapped the shoulder that resulted from SWCNT wiring (observable at 0.0–0.05 V vs. Ag in Fig. 2a, b). At these electrodes, in the presence of UA and AA, the oxidation peaks measured for DA decreased compared to the signals generated by DA alone.

Noteworthy, DA 0.1 μM was not detected in solution by any of the electrodes, and DA 1 μM was only detectable at MP/SWCNT-modified C-SPE in the absence of AA and UA.

On the contrary, when MPs were incubated in a DA/UA/AA mixture, DA could be efficiently measured in the whole concentration range assayed thanks to the confinement effect provided by the MP. The fact that DA 100 μM was the only sample in which peak height was systematically higher for the measurements performed in solution was consistent with the data displayed in Fig. 3c and confirmed that MP surface saturation had been attained. Furthermore, DA oxidation peaks measured at MP were similar both in the presence of these interferents and in the absence of them, which suggested that DA binding using MP prevented interference by UA and AA.

3.3.2. DA detection in urine

The optimized assay was finally applied to detection of DA in urine real samples. The study of urine implies fast, simple and non-invasive sample acquisition. In addition, the concentration of DA in urine is in the high nanomolar to low micromolar range in healthy individuals [4,5], while in their blood and saliva DA does not exceed the low nanomolar [27–29]. In contrast, urine composition and pH are highly variable and are determined by factors such as diet, drugs intake, or health state [30,31], which might affect negatively assay performance and reproducibility.

Here, human urine samples were spiked with increasing concentrations of DA so that, upon sample dilution in PBS tween 0.02%, diluted samples displayed similar DA concentration ranges, and were detected using MP. For each DA concentration, peak height decreased as sample complexity increased (Fig. 5a). The assay LOD worsened with sample complexity as well (Table 2). The best results were obtained for urine diluted 1:20 and 1:10, with averaged DA recoveries of 91.4% and 75.7%. DA retrieval dropped significantly

Table 2
Summary of assay LOD and concentration of DA detected in different urine dilutions.

Urine dilution	LOD ^a			DA expected in diluted sample (nM) ^b			DA measured ^c	
	%	μA	nM	100%	33%	58%	I_{Pox} (μA)	%CV
1 in 20	5	0.005	11	37	12	21	0.004	7.09
1 in 10	10	0.079	57	74	24	43	0.008	15.49
1 in 5	20	0.069	72	148	49	86	0.023	74.77
1 in 2	50	0.080	130	370	122	215	0.036	30.33
Undiluted	100	–	–	740	244	429	0.050	46.42

^a The LODs of the assay operated in the different sample dilutions were calculated from the plots displayed in Fig. 5a, which were obtained by spiking real urine samples with known concentrations of DA previous to dilution.

^b The concentration of endogenous DA expected in the urine samples after sample dilution (labeled as 100%) was calculated from the value obtained by HPLC. Concentrations labeled as 33% and 58% correspond to free DA expected if 67% and 42% of total DA were sulfoconjugated.

^c DA measured corresponds to peak height measured in (unspiked) real urine samples which, although observable, was in all cases below assay LOD. Accordingly, endogenous DA concentration could not be calculated by interpolation in the calibration plots and had to be estimated by the standard addition method.

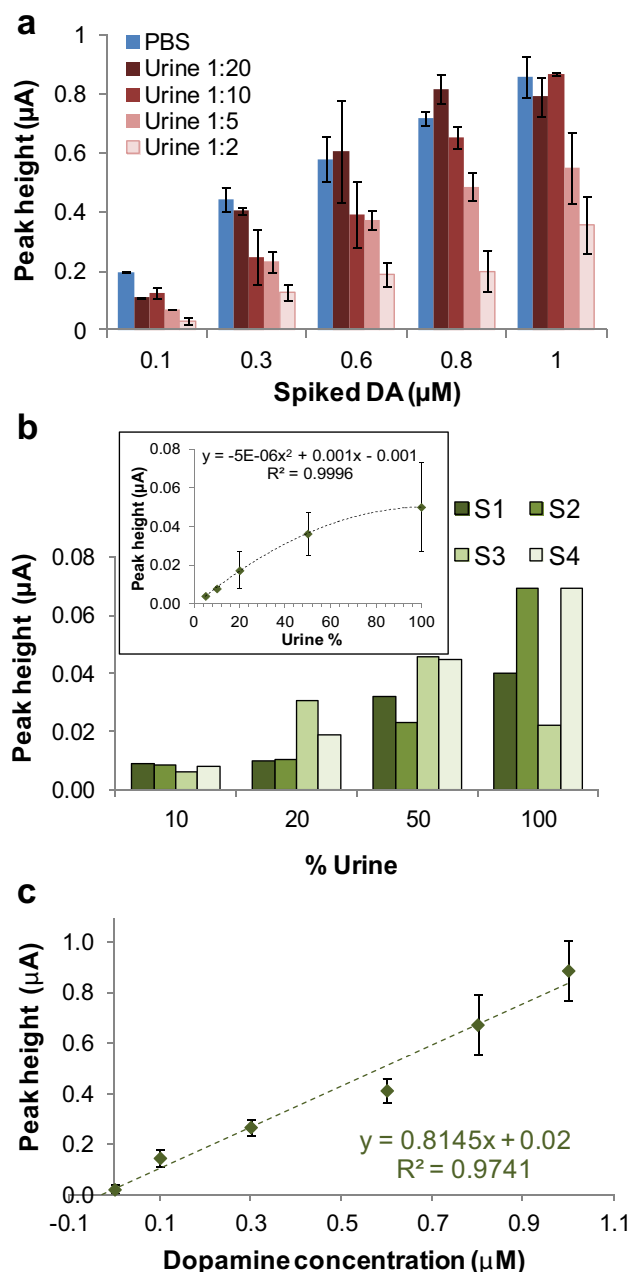


Fig. 5. CV detection of DA in urine real samples. (a) Comparative performance of the assay performed in PBS or in urine samples spiked with DA and diluted to different extent. The concentrations of DA correspond to those in diluted samples. (b) Detection of endogenous DA in four different urine real samples after dilution. (Insert) Plot of averaged peak heights registered for the four series of diluted samples. (c) Estimation of endogenous DA concentration in urine 1:10 by the standard addition method.

for less diluted samples, with averaged recoveries of 57% and 31% for urine 1:5 and urine 1:2, respectively.

In contrast to most sensors previously reported (Table 1), the optimized assay was able to bind and detect endogenous DA in unspiked urine samples (Fig. 5b, Table 2). Larger peaks were registered for more concentrated urine samples, which displayed higher DA concentrations. However, the response was not linear in the whole sample dilution range (Fig. 5b, insert). This suggested that interference due to urine composition was proportionally higher for less diluted samples, which was in accordance with the results described by other authors [32]. Independently of this, the height of the measured peaks was below the assay LOD for all the sample

dilutions (Table 2), which hampered DA quantification by interpolation in the respective calibration plots. Nevertheless, when the samples were analyzed in parallel using a reference method, this revealed concentrations around $0.74 \mu\text{M}$ DA in undiluted samples, equivalent to 37–370 nM in samples diluted 1:20–1:2.

It is known that at least 42–67% of the DA in urine is sulfoconjugated [6,33]. Hence, DA detection by established methodologies, such as chromatography and capillary electrophoresis, is usually preceded by sample pretreatment (e.g.: microdialysis, acidification, cation exchange purification, chemical derivatization, etc.) [6,33]. In the current electrochemical assay, urine samples were processed and analyzed straightforward, without any additional pre-treatment. Having less than 33–58% of DA free in solution implies that, upon dilution, the concentration of DA in the samples was in fact close to the theoretical LOD of the assay performed in the respective sample dilutions (Table 2).

In view of this, DA quantification was attempted by the standard addition method (Fig. 5c). Standard addition is a well-established approach for overcoming matrix effects in which increasing concentrations of the analyte being measured are added to different aliquots of the sample under study. Once signal registered is plotted (Y axis) against analyte concentration (X axis), the endogenous concentration of the analyte is calculated as the negative intercept of the lineal regression line ($Y=0$). DA concentrations around 24.5 nM were obtained for urine 1:10, equivalent to 245 nM of free DA in undiluted urine, which could correspond to 0.44–0.77 μM of total DA. This approaches the concentration of DA detected by the reference method ($0.74 \mu\text{M}$).

Although higher numbers of samples should be studied, our results show that the developed methodology is applicable to DA monitoring in real urine samples. Nevertheless, the current assay is still too long, consists of too many steps and manual handling, and displays a too high LOD for its realistic clinical application. Assay performance would improve if sample pretreatment strategies (such as microdialysis or cation exchange purification [6,33]) were implemented. In view of the results obtained with T1 and M280 MP, exploitation of magnetic nanoparticles instead might also contribute to reducing binding time further and/or improve CNT wiring and electrochemical detection. Finally, assay and detection automation could ameliorate result reproducibility and facilitate sample analysis.

4. Conclusions

The method proposed in this work relies on DA electrostatic binding and concentration using MP, followed by electrochemical detection by SWCNT wiring of the MP surface to the electrode. After optimization, the assay is performed in 45 min and displays an LOD of 2 nM DA in PBS-BT. DA binding is efficient using commercially available streptavidin-coated MP, without requiring any additional modification, and electrochemical detection can be done at cheap and disposable C-SPE.

The performance of the proposed method has been studied in the presence of interferents (UA and AA) and in complex sample matrices (human urine). As it has been shown, presence of UA and AA does not interfere in DA binding and electrochemical detection. Detection is possible in DA-spiked urine diluted 1:20 and 1:10, but worsens significantly for less diluted samples. The method did detect endogenous DA in all the diluted urine samples studied but the peak heights measured were below the assay LOD. This was attributed to the fact that urine samples had not been pretreated in any way and that less than 33–58% of the DA in urine is free. Estimation of the endogenous concentration of DA by the standard addition method in samples diluted 1:10 revealed a concentration ranging 0.44–0.77 μM DA in undiluted urine samples, which was in

accordance with the numbers generated by the analysis performed by an external laboratory (0.74 μM DA).

Although the currently described assay should be additionally improved for its clinical application, our results suggest that appropriately modified MP coupled to SWCNT wiring could be a useful tool for the efficient detection of electroactive targets and labels, even in complex biological samples.

Acknowledgments

E.B. is supported by the Miguel Servet program, funded by the *Instituto de Salud Carlos III* (Madrid, Spain; grant number CP13/00052) cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- [1] W. Dauer, S. Przedborski, Parkinson's disease: mechanisms and models, *Neuron* 39 (2003) 889–909.
- [2] B.J.B. Cynthia, C. Chernecky, *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*, 5th ed., Elsevier Health Sciences, 2008.
- [3] L. Dubois, D. Gray, Dopamine-secreting pheochromocytomas in search of a syndrome, *World J. Surg.* 29 (2005) 909–913.
- [4] R.N. Goyal, V.K. Gupta, N. Bachheti, R.A. Sharma, Electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of high concentration of ascorbic acid using a fullerene-C60 coated gold electrode, *Electroanalysis* 20 (2008) 757–764.
- [5] Z.D. Peterson, D.C. Collins, C.R. Bowerbank, M.L. Lee, S.W. Graves, Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 776 (2002) 221–229.
- [6] J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves, A. Falcao, Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – a review, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 12–34.
- [7] S. Alwarappan, G. Liu, C.-Z. Li, Simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid at electrochemically pretreated carbon nanotube biosensors, *Nanomedicine* 6 (2010) 52–57.
- [8] M. Hadi, A. Rouhollahi, Simultaneous electrochemical sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid at anodized nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode, *Anal. Chim. Acta* 721 (2012) 55–60.
- [9] S.-J. Li, J.-Z. He, M.-J. Zhang, R.-X. Zhang, X.-L. Lv, S.-H. Li, et al., Electrochemical detection of dopamine using water-soluble sulfonated graphene, *Electrochim. Acta* 102 (2013) 58–65.
- [10] B. Habibi, M.H. Pournaghi-Azar, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 5492–5498.
- [11] J. Ping, J. Wu, Y. Wang, Y. Ying, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode, *Biosens. Bioelectron.* 34 (2012) 70–76.
- [12] J. Yan, S. Liu, Z. Zhang, G. He, P. Zhou, H. Liang, et al., Simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on graphene anchored with Pd–Pt nanoparticles, *Colloid. Surf. B: Biointerfaces* 111 (2013) 392–397.
- [13] Z. Liu, J. Wang, D. Xie, G. Chen, Polyaniline-coated Fe_3O_4 nanoparticle – carbon-nanotube composite and its application in electrochemical biosensing, *Small* 4 (2008) 462–466.
- [14] E. Baldrich, F.X. Muñoz, Carbon nanotube wiring: a tool for straightforward electrochemical biosensing at magnetic particles, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9244–9250.
- [15] F. Araújo de Souza Ribeiro, C.R.T. Tarley, K.B. Borges, A.C. Pereira, Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of *Cucurbita pepo* L, *Sens. Actuators B: Chem.* 185 (2013) 743–754.
- [16] C. Xue, Q. Han, Y. Wang, J. Wu, T. Wen, R. Wang, et al., Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 199–203.
- [17] L. Wu, L. Feng, J. Ren, X. Qu, Electrochemical detection of dopamine using porphyrin-functionalized graphene, *Biosens. Bioelectron.* 34 (2012) 57–62.
- [18] A. Liu, M.D. Wei, I. Honma, H. Zhou, Biosensing properties of titanatenanotube films: selective detection of dopamine in the presence of ascorbate and uric acid, *Adv. Funct. Mater.* 16 (2006) 371–376.
- [19] P. Rattanarat, W. Dungchai, W. Siangproh, O. Chailapakul, C.S. Henry, Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples, *Anal. Chim. Acta* 744 (2012) 1–7.
- [20] R. Olivé-Monllau, F.X. Muñoz-Pascual, E. Baldrich, Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: application to paracetamol detection, *Sens. Actuators B: Chem.* 185 (2013) 685–693.
- [21] F. Li, L. Mei, Y. Li, K. Zhao, H. Chen, P. Wu, et al., Facile fabrication of magnetic gold electrode for magnetic beads-based electrochemical immunoassay: application to the diagnosis of Japanese encephalitis virus, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4253–4256.
- [22] N.F. Atta, A. Galal, E.H. El-Ads, Gold nanoparticles-coated poly(3 4-ethylene-dioxythiophene) for the selective determination of sub-nano concentrations of dopamine in presence of sodium dodecyl sulfate, *Electrochim. Acta* 69 (2012) 102–111.
- [23] I. Streeter, G.G. Wildgoose, L. Shao, R.G. Compton, Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: an analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes, *Sens. Actuators B: Chem.* 133 (2008) 462–466.
- [24] J. Barallat, R. Olivé-Monllau, J. Gonzalo-Ruiz, R. Ramírez-Satorras, F.X. Muñoz-Pascual, A.G. Ortega, et al., Chronoamperometric magneto immunosensor for myeloperoxidase detection in human plasma based on a magnetic switch produced by 3D laser sintering, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9049–9056.
- [25] L.M. Woods, Ş.C. Bădescu, T.L. Reinecke, Adsorption of simple benzene derivatives on carbon nanotubes, *Phys. Rev. B* 75 (2007) 155415.
- [26] F. Banhart, Interactions between metals and carbon nanotubes: at the interface between old and new materials, *Nanoscale* 1 (2009) 201–213.
- [27] T. Okumura, Y. Nakajima, M. Matsuoka, T. Takamatsu, Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 694 (1997) 305–316.
- [28] M. Alvelos, A. Ferreira, P. Bettencourt, P. Serrao, M. Pestana, M. Cerqueira-Gomes, et al., The effect of dietary sodium restriction on neurohumoral activity and renal dopaminergic response in patients with heart failure, *Eur. J. Heart Fail* 6 (2004) 593–599.
- [29] D.S. Goldstein, G.Z. Feuerstein, I.J. Kopin, H.R. Keiser, Validity of liquid chromatography with electrochemical detection for measuring dopamine in human plasma, *Clin. Chim. Acta* 117 (1981) 113–120.
- [30] R. Siener, A. Jahnen, A. Hesse, Influence of a mineral water rich in calcium magnesium and bicarbonate on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallization, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58 (2004) 270–276.
- [31] W.-M. Li, Y.-H. Chou, C.-C. Li, C.-C. Liu, S.-P. Huang, W.-J. Wu, et al., Association of body mass index and urine pH in patients with urolithiasis, *Urol. Res.* 37 (2009) 193–196.
- [32] T.P. Taylor, M.G. Janech, E.H. Slate, E.C. Lewis, J.M. Arthur, J.C. Oates, Overcoming the effects of matrix interference in the measurement of urine protein analytes, *Biomark Insights* 7 (2012) 1–8.
- [33] K. Vuorensoola, H. Siren, U. Karjalainen, Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 788 (2003) 277–289.

Biographies

Zorione Herrasti was graduated in Physics and she received her M.S. degree in Nanoscience from Universidad del País Vasco (Spain) in 2010 and 2011 respectively. She developed her master thesis “Fabrication and characterization of electrochemical sensors” in IK4-Ikerlan. Currently she is doing her Ph.D. thesis on “Nanostructured surfaces based on CNT magnetic entrapment for electrochemical biosensors” in IK4-Ikerlan.

Fernando Martínez received his B.S. degree in Industrial Engineering at Mondragon University (Spain) and his M.S. degree in Automation and Electronics Engineering at University Paul Sabatier (France). He obtained his Ph.D. in Industrial Engineering at Institut National Polytechnique de Toulouse (France) in 1993. Currently, he is the head of the Sensors Department at IK4-Ikerlan. His research activities include design and development of sensors and their application to the monitoring of products and industrial processes. He has participated and coordinated several national and international research projects in domains related to: design of transducers, autonomous sensor integration, optoelectronic systems, mechatronic systems and intelligent structures.

Eva Baldrich received the Ph.D. degree in Biological Sciences from the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) in 1998. She then worked for 2 years at the University of Cambridge (UK) in the detection and characterization of new virus variants. In 2002 she joined the Nanotechnology and Bioanalysis group, at the Universitat Rovira Virgili (Tarragona, Spain), and in 2006 she moved to the BioMEMS group at IMB-CNM (CSIC). From 2014 she leads the Diagnostic Nanotools Group at Vall d'Hebron Hospital Research Institute. Her main area of expertise is fast assay and biosensor development with diagnostic purposes.

A.2.1.4. Carbon nanotube wiring for signal amplification of electrochemical magneto immunosensors: application to myeloperoxidase detection

Carbon nanotube wiring for signal amplification of electrochemical magneto immunosensors: application to myeloperoxidase detection

Zorione Herrasti · Fernando Martínez · Eva Baldrich

Received: 17 March 2014 / Revised: 30 May 2014 / Accepted: 5 June 2014 / Published online: 4 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract In this work, chronoamperometric myeloperoxidase (MPO) detection was accomplished using immunofunctionalized magnetic microparticles (MPs), disposable carbon screen-printed electrodes (C-SPEs), and a ready-to-use commercially available tetramethylbenzidine (TMB)-based enzymatic substrate. In order to reach the limit of detection (LOD) needed to study real blood serum samples, assay performance was additionally improved by exploiting CNT wiring, which amplified the signal and decreased the LOD. The optimized assay can be performed in 30 min and yields LODs of 6 and 55 ng mL⁻¹ in PBS and undiluted human serum, respectively, making it useful for the identification of patients at risk of cardiovascular disease. These results demonstrate that electrode nanostructuring can be accomplished “post-assay,” which favors the development of enhanced magneto immunosensors based on the exploitation of cheap and simple SPE devices.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-7954-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Z. Herrasti · F. Martínez
IK4-Ikerlan Technological Research Centre, 20500 Mondragón,
Spain

E. Baldrich
Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC), Esfera
UAB, Campus Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra, Spain

E. Baldrich (✉)
Diagnostic Nanotools, Molecular Biology and Biochemistry
Research Center for Nanomedicine (Cibbim-Nanomedicine), Vall
d’Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de
Barcelona, Passeig de la Vall d’Hebron 119-129, 08035 Barcelona,
Spain
e-mail: eva.baldrich@vhir.org

Keywords Carbon nanotube (CNT) wiring · Magnetic particles (MP) · Myeloperoxidase (MPO) · Electrochemical biosensor · Tetramethylbenzidine (TMB)

Introduction

The World Health Organization estimates that in 2008 at least 17.3 million people died from cardiovascular diseases (CVDs) and that by 2030 CVDs will cause more than 23 million deaths annually [1]. Therefore, CVDs are one of the leading causes of death in the world. In the near future, CVDs will become especially important in developing countries, where globalization of sanitation and access to drugs and medical care will presumably result in increased longevity, while changes in dietary consumption and lifestyle will have a negative effect on the health of the global population [1]. CVDs are usually diagnosed nowadays via classical methods, which must be conducted in central laboratories by specialized staff and may take several hours or even days. These include (among others) cardiac characterization by electrocardiogram, chest X-ray, electrophysiology, biopsy, and imaging, as well as the quantification of cardiovascular biomarkers such as troponin, creatine kinase, myoglobin, and myeloperoxidase in the patient’s blood [2]. Although a number of bioassays and point-of-care devices for CVD diagnosis have been commercialized, there is a growing demand for rapid, cheap, and reliable diagnostic tools for these diseases. In this context, the development of truly low-cost electrochemical biosensors is still unresolved and would enable efficient CVD diagnosis in all kinds of settings [2].

Myeloperoxidase (MPO) is a 150-kDa peroxidase enzyme that is released into the extracellular fluid and general circulation during inflammatory conditions. MPO monitoring has been proposed as a sensitive predictor for myocardial infarction [3, 4]. Moreover, Baldus et al. hypothesized that

augmented levels of MPO may identify patients at increased risk for cardiovascular events, regardless of the occurrence of myocardial necrosis [5]. This hypothesis was confirmed by Brennan et al. [3] and Meuwese et al. [6], who showed that—in contrast to well-established biomarkers such as troponin T, creatine kinase MB isoforms, and C-reactive protein—studying MPO levels allowed the identification of patients at risk even if they did not present myocardial necrosis. To the best of our knowledge, only a few examples of electrochemical immunosensors for MPO detection have been reported. All of those are based on the exploitation of highly sensitive electrodes produced using long and complex fabrication and/or modification strategies (Table 1) [7–12].

In the work reported in the present paper, MPO was detected using cheap and commercially available screen-printed electrodes (SPEs). In order to do so, MPO was immunocaptured and concentrated using magnetic particles (MPs), endogenous MPO peroxidase activity was monitored using a ready-to-use enzymatic substrate, and signal amplification was accomplished by CNT wiring. Our results suggest that CNT electrochemical wiring could be an excellent tool for improving pre-existing magneto immunoassays.

Material and methods

Unless otherwise stated, all incubations were performed in Eppendorf tubes, at room temperature, protected from light, and under continuous rotation (10 rpm). Streptavidin-coated MPs (T1, 1 μm in diameter; Life Technologies, Alcobendas, Madrid, Spain) were modified with biotinylated anti-MPO antibodies (ref. 4M43B-MAb16E3; HyTest, Turku, Finland), blocked with biotin, and resuspended in PBS BSA 0.1 % for storage at 4 °C (MPs-antiMPO, $3\text{--}6 \times 10^8$ MP mL⁻¹).

After washing them with PBS (0.01 M phosphate, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.4), the MPs-antiMPO were rotated with 100 μL of sample for 10–60 min. The MPs were then washed twice with 500 μL of PBS Tween 0.05 % (PBS-T) and

once with 100 μL of PBS-T before being resuspended in 10 μL of PBS for subsequent spectrophotometric or chronoamperometric detection.

For the spectrophotometric detection of MPO activity, MPs (10 μL) were transferred to clean Eppendorf tubes, 100 μL of ready-to-use TMB liquid substrate (ref. 0440; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) were added, and the tubes were rotated for 20 min. The reaction was stopped with 50 μL of 1 M HCl. One hundred microliters of the supernatant were then transferred to a microtiter plate, and the absorbance was read at 450 nm using an Ascent Multiskan EX ELISA reader (Thermo Scientific, Madrid, Spain).

For the chronoamperometric detection of MPO activity, MPs (10 μL) were concentrated on the surface of a carbon screen-printed electrode (C-SPE; Dropsens, Oviedo, Spain) using a magnet. A 50- μL drop of PBS was added and measurement was performed at 0 V for 400 s to allow for signal stabilization. The measurement was then paused, PBS was substituted by 50 μL of TMB enzymatic substrate (Enhanced K-Blue[®] or K-Blue[®] Aqueous Substrate; Neogen Corporation, Ayr, Scotland, UK), and the measurement was resumed for another 400 s. The current registered for each MPO concentration, ΔI , was calculated by subtracting the current measured after signal stabilization in PBS from the current measured after signal stabilization in TMB.

CNT suspensions were prepared by sonicating 10 mg of carboxylated single-walled CNTs (Sigma–Aldrich) in 10 mL of deionized water for 90 min. For signal amplification by CNT wiring, MPs were mixed with threefold-concentrated PBS and 1–4 μL of carboxylated single-walled CNTs. Salt addition induces transient destabilization of the aqueous CNT suspension and promotes the random adsorption of the CNTs onto the MP surface [13]. Confinement on the electrode surface using a magnet and chronoamperometric detection were then performed as described above.

A more detailed description of the materials and methodology used is included in the “[Electronic supplementary material](#)” (ESM).

Table 1 Previously reported electrochemical immunosensors for MPO detection

Electrode	Detection method	Linear range	LOD	Reference
Microfabricated Pt electrode, 3D holder with switchable magnets, and MPs 1 μm in diameter	Chronoamperometry	0.9–60 ng mL ⁻¹	0.4 ng mL ⁻¹	[7]
Biogenic nanoporous silica-based sensor	Electrochemical impedance spectroscopy	1 pg mL ⁻¹ to 1 μg mL ⁻¹	1 pg mL ⁻¹	[8]
Iridium oxide nanowire-based device	Electrochemical impedance spectroscopy	1–1,000 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	[9]
MWCNT–ionic liquid–cerium dioxide film-modified electrode	Cyclic voltammetry	5–300 ng mL ⁻¹	0.2 ng mL ⁻¹	[10]
NanoAu/cerium dioxide–BMIMPF ₆ /L-cysteine composite film	Cyclic voltammetry	10–400 ng mL ⁻¹	0.06 ng mL ⁻¹	[11]
ITO electrode modified with an ionic liquid composite containing AuNPs, poly (<i>o</i> -phenylenediamine), and CNTs	Cyclic voltammetry	0.2–23 ng mL ⁻¹	0.05 ng mL ⁻¹	[12]

Results and discussion

Immunoassay spectrophotometric optimization

In the work described here, the detection of MPO was based on immunocapture and concentration using MPs modified with anti-MPO antibodies (MPs-antiMPO), and the subsequent monitoring of the endogenous peroxidase activity of MPO using TMB/H₂O₂ as the enzymatic substrate (Fig. 1a). The magneto immunoassay was first optimized spectrophotometrically, which enabled simultaneous detection of numerous samples and facilitated optimization.

First, the amount of MPs-antiMPO needed in the immunoassay was studied. With this aim, 6–10 μ L of MPs-antiMPO were incubated for 30 min with increasing concentrations of MPO in PBS, 0.1 % BSA, and 0.02 % Tween (PBS-BT). After washing them, the MPs were incubated with TMB for 20 min, the reaction was stopped with acid, and the absorbance was read at 450 nm.

The signals registered were proportional to the concentration of MPO in all cases (Fig. 1b). In line with previous observations, assay reproducibility was slightly better for higher amounts of MPs, which was attributed to enhanced magnetic recovery of the MPs after the incubation and washing steps [14, 7]. However, higher signals were registered for

lower MP loads (6 μ L). Since MPO is a dimeric protein, it was presumed that the use of more beads led to MP cross-binding and aggregation, which ultimately affected the enzymatic activity of MPO in a negative way. Accordingly, 6 μ L of MPs-antiMPO were used in subsequent experiments, which also helped to reduce the cost of the assay.

The optimal immunocapture time was then determined. To achieve this, 6 μ L of MPs-antiMPO were rotated for different times in PBS-BT containing increasing MPO concentrations. The MPs were then processed as described above. Again, the signal generated was proportional to MPO concentration for all incubation times tested (Fig. 1c). The signal was higher for 15-min immunocaptures than for 10-min incubations. However, longer assays did not produce better results: on the contrary, signal saturation and even slightly decreased signals were observed for incubations lasting longer than 15 min. This was especially true for high MPO concentrations. As before, this could be caused by the occurrence of a certain degree of MP cross-binding and aggregation when longer binding times were employed, although this was not studied any further.

In view of these results, it was decided that the immunoassay should consist of a 15-min immunocapture using 6 μ L of MPs per 100 μ L of sample, which yielded a relatively fast and cheap assay. Under these conditions, the negative control experiments (performed using MPs that had not been

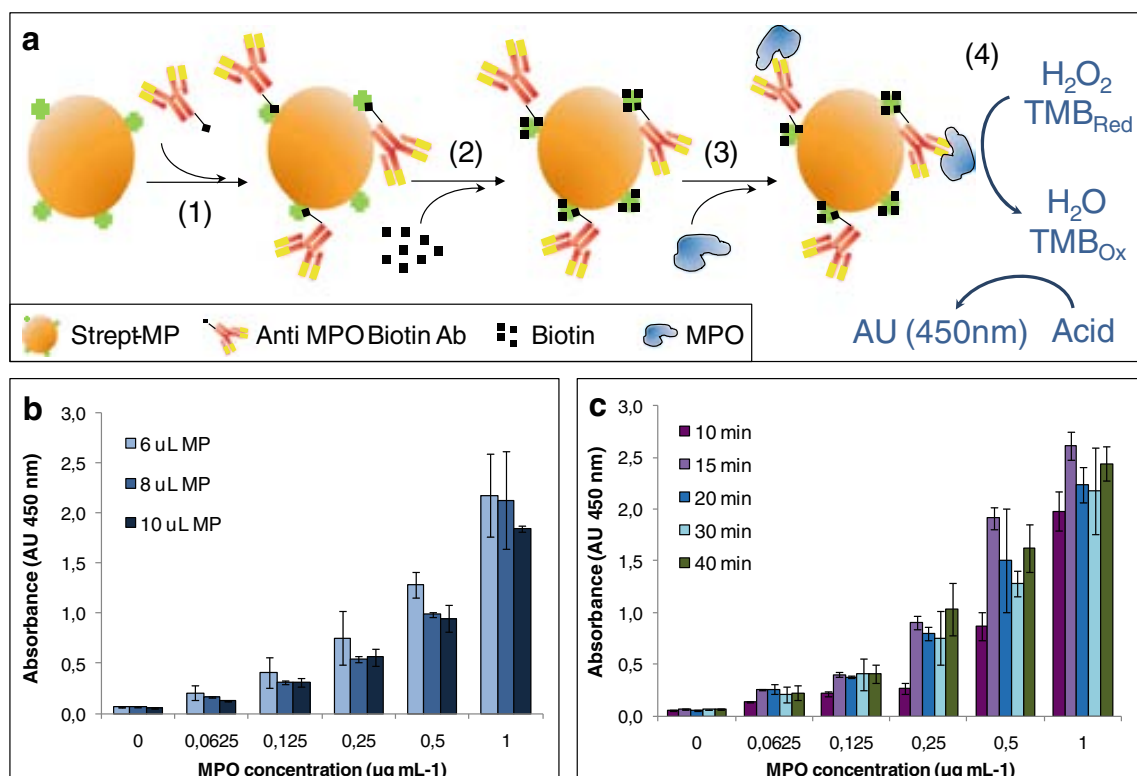


Fig. 1a–c Magneto immunoassay spectrophotometric optimization. **a** Scheme for MPs-antiMPO production and the magneto immunocapture and spectrophotometric detection of MPO. **b** Signals generated by increasing concentrations of MPO after immunocapture using different

amounts of MPs-antiMPO. **c** Signals produced by increasing concentrations of MPO after different immunocapture times using 6 μ L of MPs-antiMPO

modified with antibodies) generated undetectable levels of MPO-nonspecific adsorption (data not shown).

Electrochemical detection of the magneto immunoassay

Electrochemical peroxidase detection is usually performed using freshly prepared enzymatic substrates that contain H_2O_2 and a redox mediator such as TMB or hydroquinone. In this context, MPO catalyzes the oxidation of the mediator by H_2O_2 . Subsequent electrochemical detection relies on the electrochemical reduction of enzymatically produced oxidized mediator at an electrode surface.

In spite of its efficiency, the exact composition and performance of the custom-made substrate solution can change from day to day, which may increase signal variability between experiments. Having to prepare the substrate solution daily also makes it complicated to perform the detection outside the laboratory, where a balance is not available to weight the different components. Remarkably, numerous ready-to-use stabilized substrate mixtures are now commercially available. However, because their compositions have been optimized for peroxidase optical/spectrophotometric analysis, they are seldom exploited for electrochemical detection. Here, we explored the electrochemical performances of two commercially available ready-to-use TMB/ H_2O_2 preparations: Enhanced K-Blue Substrate and K-Blue Aqueous Substrate from Neogen Corporation.

For the chronoamperometric measurements, MPO was submitted to immunocapture and washing and MPs were confined onto the surface of a C-SPE. The signal was then allowed to stabilize in PBS, followed by measurement in the appropriate enzyme substrate. The signal registered for each concentration of MPO, ΔI , was calculated by subtracting the current measured after signal stabilization in PBS ($t=400$ s) from the current measured in TMB ($t=800$ s).

Under those experimental conditions, MPO was efficiently detected at levels between 0.0625 and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The Enhanced K-Blue Substrate generated higher signals for all the concentrations of MPO tested, but also a significantly higher background current (Fig. 2b). As a result, the assay's limit of detection (LOD; 3σ) was very high (510 ng mL^{-1} of MPO). If the Enhanced K-Blue Substrate was diluted 1:2.5 with PBS, the signals registered in the presence of MPO were greater than the currents generated by the undiluted substrate. At the same time, the background noise decreased slightly, which reduced the LOD (217 ng mL^{-1} of MPO). However, when this substrate was diluted farther, the currents registered declined. These results suggest that the composition of this reagent was not appropriate for MPO electrochemical detection.

The K-Blue Aqueous Substrate generated significantly lower signals for all the concentrations of MPO assayed and yielded a lower assay sensitivity (measured as the graph slope)

than the Enhanced K-Blue Substrate. However, it also produced a significantly lower background current. Accordingly, it provided the lowest LOD observed, 17.7 ng mL^{-1} of MPO, which was 28 and 12 times lower than the values obtained for undiluted and diluted Enhanced K-Blue Substrate, respectively. For this reason, K-Blue Aqueous Substrate was selected for subsequent experiments. Nevertheless, the LOD obtained here was significantly higher than the values reported by other authors (Table 1) [7–12, 15], and was not low enough to permit the study of clinical samples.

Signal amplification by CNT wiring

Signal amplification was attempted by implementing CNT wiring. CNT wiring is based on the fact that CNTs tend to adsorb randomly onto the surface of MPs. The resulting CNT/MP complexes can then be layered onto an electrode surface using a magnet [13, 16, 17]. As a result, the CNTs form a tridimensional web that connects the MPs between them and with the electrode surface (Fig. 2a and Fig. S1 in the ESM). CNT wiring has been previously exploited for the electrochemical detection of electroactive molecules, such as dopamine and ferrocene carboxylic acid, after binding them to the surface of MPs [13, 16, 17]. Here, we investigated if the adsorption of CNTs onto MPs could improve the electrochemical detection of enzyme activity as well.

To do this, immediately after MPO immunocapture and washing, the MPs were mixed with 0–4 μL of CNTs. The CNT/MP complexes formed were observable by the naked eye and could be concentrated using a magnet onto the surface of a C-SPE. MPO chronoamperometric detection was then performed as described above (Fig. 2c). Both the background current and the assay variability were slightly higher for the CNT-modified devices, due to the larger effective areas and more complex production paths of these electrodes, respectively [13, 16, 17]. For all the concentrations of MPO tested, signal improved as the amount of CNTs was increased up to 3 μL , before decreasing if the amount of CNTs was increased further. The signal also stabilized more slowly for CNT amounts >3 μL , which was attributed to poorer diffusion of the enzyme substrate across thicker CNT layers.

As before, higher signals but also higher background currents were registered when using Enhanced K-Blue Substrate, diluted or not (see Fig. S2 in the ESM). Even though the LOD decreased to 73 ng mL^{-1} for 3 μL of CNTs (compared to 217 ng mL^{-1} without CNTs), this value was still unacceptably high. On the contrary, an LOD of 6 ng mL^{-1} MPO was obtained using K-Blue Aqueous Substrate, which was nearly threefold lower than that achieved for detection without CNT. The physiological concentration of MPO in the blood serum of a healthy individual is <95 ng mL^{-1} , and it commonly increases to >600 ng mL^{-1} in patients displaying CVD [7].

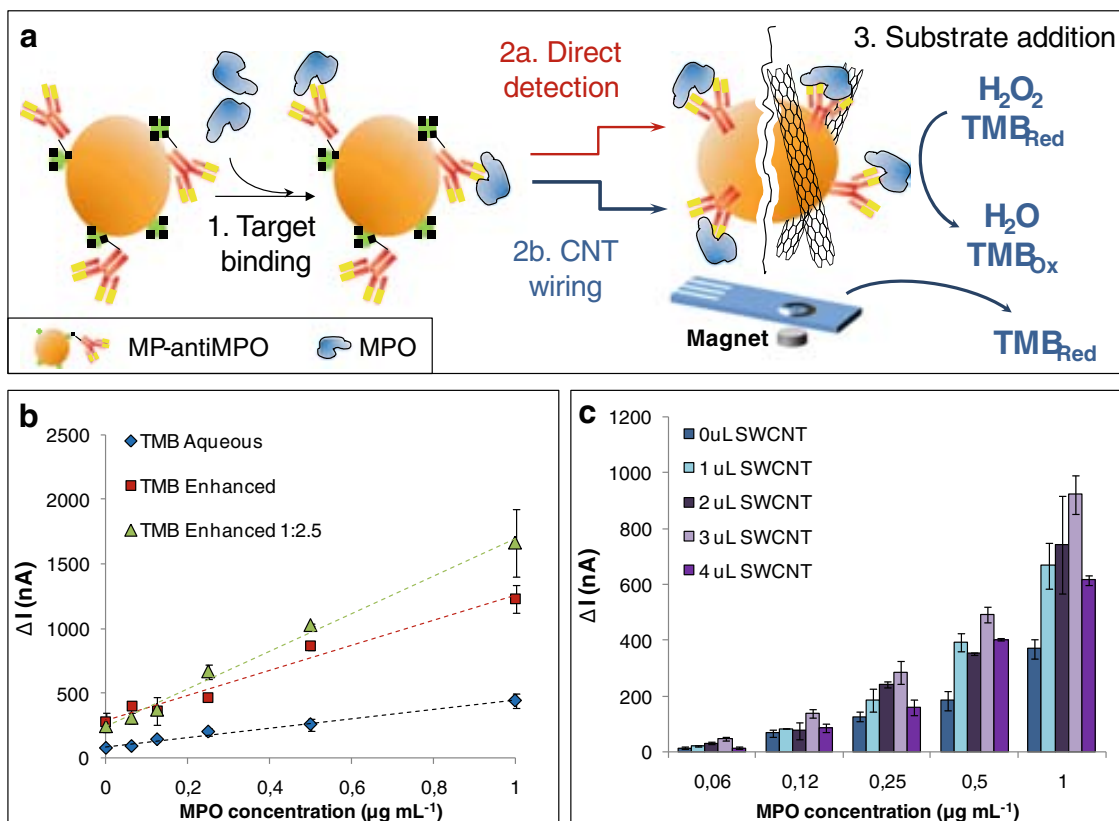


Fig. 2a–c Magnetoimmunoassay chronoamperometric measurements. **a** Scheme of MPs-antiMPO MPO capture and either direct detection (*left*) or detection after CNT wiring (*right*). **b** Chronoamperometric ΔI signals registered for different concentrations of MPO using different

commercially available TMB/ H_2O_2 solutions. **c** Signals produced by increasing concentrations of MPO after classical detection (0 μL of SWCNTs) or after detection by CNT wiring using different amounts of CNT

Hence, it was concluded that it immunoassay could be utilized to study real samples.

Assay performance in human serum

Figure 3a and Fig. S3 in the ESM show the calibration plot obtained for MPO concentrations ranging from 0 to 4 $\mu g mL^{-1}$ in PBS-BT, as well as some of the chronoamperograms registered. The optimized electrochemical magneto immunoassay consisted of immunocapture for 15 min with 6 μL of MPs-antiMPO and electrochemical detection by CNT wiring (3 μL) at a C-SPE. The assay displayed a linear response from 0 to 0.12 $\mu g mL^{-1}$ of MPO, a polynomial trend over the whole range of concentrations studied (0–4 $\mu g mL^{-1}$; $r^2=0.999$), and signal saturation above 4 $\mu g mL^{-1}$.

The proposed method was finally assayed in human blood serum (Sigma–Aldrich). To this end, the serum was diluted 1:100, 1:50, and 1:10 in PBS Tween 0.02 %, and these dilutions were spiked with similar final MPO concentrations. It was expected that MPO recovery and assay performance would worsen with sample complexity, which had been observed previously and was attributed to slower analyte

diffusion rates and binding kinetics in more viscous and complex matrices [7]. Figure 3b shows the calibration plots obtained for the different serum dilutions. In all cases, MPO recoveries ranged between 84 and 114 %, with average recoveries of 110, 99, and 97 % in serum diluted 1:100, 1:50, and 1:10, respectively. Unexpectedly, sample complexity helped to restrict the variability in the signals from the blanks, resulting in LODs of the order of 3–9 $ng mL^{-1}$. At the same time, implementing a short incubation time and performing a series of washes under rotation presumably limited nonspecific binding of nontarget components and prevented interference with the subsequent CNT wiring, which was an issue after longer incubations [16]. In the case of serum diluted 1:10, we achieved an LOD of 5.43 $ng mL^{-1}$, which corresponded to 54.3 $ng mL^{-1}$ MPO in undiluted human serum. Since the physiological concentration of MPO varies between <95 $ng mL^{-1}$ in healthy individuals and >600 $ng mL^{-1}$ in CVD patients [7], the assay reported here would be able to distinguish between these two types of samples.

The LODs reported here, 6 and 55 $ng mL^{-1}$ of MPO in PBS and undiluted human serum, are higher than the values claimed by other authors (0.05–0.4 $ng mL^{-1}$, see Table S1 in the ESM). However, those works describe MPO detection

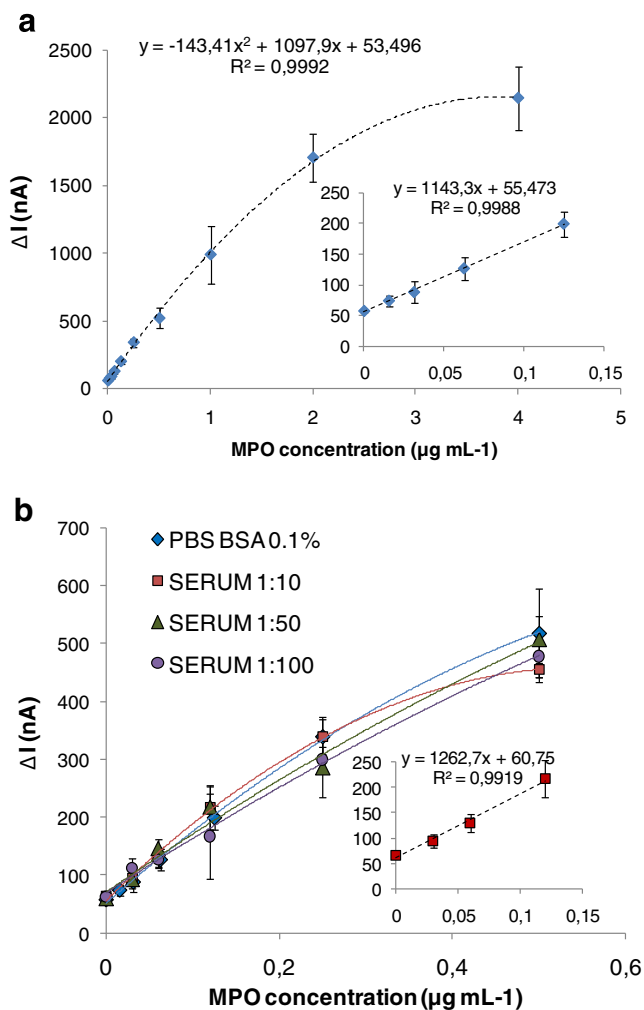


Fig. 3a–b Chronoamperometric measurements. **a** Calibration plot of the current registered versus the concentration of MPO. Measurements performed by CNT wiring using 3 μL of SWCNT, TMB Aqueous Substrate, and C-SPE. *Insert:* Close-up of the main graph showing the assay's linear range between 0 and 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. **b** Comparison of the performance of the optimized magneto immunosensor in PBS BSA 0.1 % and human serum diluted 1:10. In both cases, similar final spiked concentrations of MPO were employed. *Insert:* Close-up of the main graph in the range 0–0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtained for 1:10 human serum

schemes that exploit complex electrode surface modification strategies and/or high-quality microfabricated devices, which are more difficult to mass fabricate and implement in real diagnostic settings than the alternative reported here. For instance, Venkatraman and coworkers used a microelectrode produced by standard photolithography, nanostructured with iridium oxide nanowires by metal organic chemical vapor deposition (MOCVD), and modified with antibodies by streptavidin–biotin binding for MPO detection by electrochemical impedance spectroscopy (LOD 0.5 ng mL^{-1}) [9]. The chronoamperometric magneto immunoassay described in Barallat et al. [7] (LOD 0.4 ng mL^{-1}) took 1 h and used photolithographically fabricated electrodes, which are more sensitive but also more difficult and expensive to produce than

SPEs. Finally, in the works reported by Lu et al. and Liu et al. (LODs 0.05–0.2 ng mL^{-1}), the electrodes were modified with multilayer (nano)composites following complex procedures that took hours to accomplish [7, 10–12].

On the contrary, the assay reported here takes 30 min and uses commercially available MPs and enzyme substrate, as well as cheap and disposable C-SPEs, which makes it affordable to many potential users. The MPs-antiMPO maintained their performance even after one month of storage at 4 °C (see Fig. S4 in the ESM). Furthermore, the fact that straightforward electrochemical detection at C-SPEs provides limited detectability is circumvented in the present assay by implementing CNT wiring, which produces larger signals and a lower LOD. As demonstrated here, the resulting level of signal amplification and improvement in LOD are enough to permit its application to human blood serum.

Conclusions

In this work, chronoamperometric detection of MPO in human serum was achieved with an LOD and assay range that are compatible with MPO monitoring in real samples.

This method detects MPO via immunocapture and concentration using MPs-antiMPO. The utilization of smaller MPs than in previous works [7] allowed the immunocapture time to be reduced to just 15 minutes, which limits interference from complex matrix samples. Cheap and disposable C-SPEs and a ready-to-use enzyme substrate solution are used for the measurements. As shown here, incorporating electrochemical CNT wiring increases the signal and decreases the assay's LOD. Although the LODs achieved in this work are higher than the values found in the literature, an LOD of 55 ng mL^{-1} in undiluted human serum would be enough to be able to identify real samples from patients at risk of CVD. Furthermore, these results suggest that CNTs could be a useful tool for the optimization and improvement of enzyme-linked electrochemical magneto immunoassays using low-cost and disposable SPEs.

Acknowledgments E.B. is supported by the Miguel Servet program, funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III (CP13/00052).

References

1. WHO (2013) Prevention and control of noncommunicable diseases in the European Region: a progress report. WHO, Geneva
2. Qureshi A, Gurbuz Y, Niazi JH (2012) Biosensors for cardiac biomarkers detection: a review. *Sens Actuators B* 171–172(0):62–76. doi:10.1016/j.snb.2012.05.077
3. Brennan M-L, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ,

- Nissen SE, Hazen SL (2003) Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 349(17):1595–1604. doi:10.1056/NEJMoa035003
- Lau D, Baldus S (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 111(1):16–26. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.023
 - Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW, CAPTURE Investigators (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108(12):1440–1445. doi:10.1161/01.cir.0000090690.67322.51
 - Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJP, Khaw K-T, Boekholdt SM (2007) Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 50(2):159–165
 - Barallat J, Olivé-Monllau R, Gonzalo-Ruiz J, Ramírez-Satorras R, Muñoz-Pascual FX, Ortega AG, Baldrich E (2013) Chronoamperometric magneto immunosensor for myeloperoxidase detection in human plasma based on a magnetic switch produced by 3D laser sintering. *Anal Chem* 85(19):9049–9056. doi:10.1021/ac401549d
 - Lin KC, Kunduru V, Bothara M, Rege K, Prasad S, Ramakrishna BL (2010) Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. *Biosens Bioelectron* 25(10):2336–2342
 - Venkatraman VL, Reddy RK, Zhang F, Evans D, Ulrich B, Prasad S (2009) Iridium oxide nanomonitors: clinical diagnostic devices for health monitoring systems. *Biosens Bioelectron* 24(10):3078–3083. doi:10.1016/j.bios.2009.03.029
 - Lu LL, Liu B, Xie G (2010) Amperometric immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on a multi-wall carbon nanotubes–ionic liquid–cerium dioxide film-modified electrode. *Bull Kor Chem Soc* 31(31):3259–3264
 - Lu L, Liu B, Li S, Zhang W, Xie G (2011) Improved electrochemical immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on nanogold/cerium dioxide-BMIMPF₆/L-cysteine composite film. *Colloids Surf B* 86(2):339–344. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.017
 - Liu B, Lu L, Li Q, Xie G (2011) Disposable electrochemical immunosensor for myeloperoxidase based on the indium tin oxide electrode modified with an ionic liquid composite film containing gold nanoparticles, poly(*o*-phenylenediamine) and carbon nanotubes. *Microchim Acta* 173(3–4):513–520. doi:10.1007/s00604-011-0575-6
 - Olivé-Monllau R, Muñoz-Pascual FX, Baldrich E (2013) Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: application to paracetamol detection. *Sens Actuators B* 185(0):685–693. doi:10.1016/j.snb.2013.05.066
 - Herrasti Z, Olivé-Monllau R, Muñoz-Pascual FX, Martínez F, Baldrich E (2014) Electrochemical biosensing of non-electroactive targets using ferrocene-labeled magnetic particles and CNT wiring. *Analyst (Cambridge, UK)* 139(6):1334–1339
 - McDonnell B, Hearty S, Finlay WJJ, O’Kennedy R (2011) A high-affinity recombinant antibody permits rapid and sensitive direct detection of myeloperoxidase. *Anal Biochem* 410(1):1–6. doi:10.1016/j.ab.2010.09.039
 - Baldrich E, Muñoz FX (2011) Carbon nanotube wiring: a tool for straightforward electrochemical biosensing at magnetic particles. *Anal Chem* 83(24):9244–9250. doi:10.1021/ac201137q
 - Baldrich E, Gómez R, Gabriel G, Muñoz FX (2011) Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: application to dopamine detection. *Biosens Bioelectron* 26(5):1876–1882. doi:10.1016/j.bios.2010.03.020

A.2.2. Congresos

Biosensors and Bioelectronics 2012

LOC Device For DNA Electrochemical Qualitative Detection

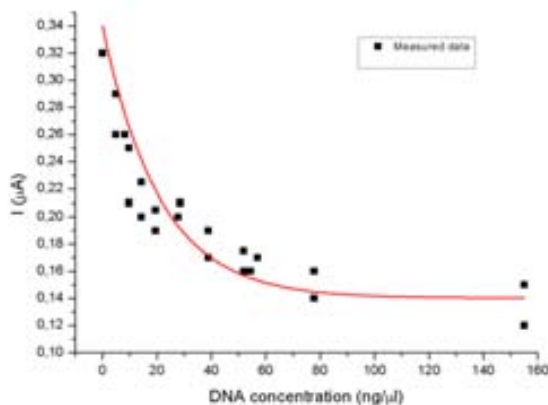
Z.Herrasti*¹, M.Agirregabiria¹, M.P.Martínez¹, F.Martínez¹

¹Ikerlan-IK.4, Spain

zherrasti@ikerlan.es

In this work we have substituted the optical DNA detection of a Lab on a Chip (LOC) (Ruano-López et al., 2011) by an electrochemical detection system, with the aim to simplify and reduce the cost of the mentioned device, in the case of qualitative DNA detection measurements. The LOC system consists of a portable platform reader-actuator and a disposable Labcard capable of performing nucleic acid concentration, amplification and electrochemical detection. The sample is injected in the labcard and, after the elution of the DNA, it is transferred to the PCR chamber, where the DNA is amplified and transferred to the detection chamber. In this chamber electrochemical sensors are integrated and for the DNA electrochemical detection improvement, a solution of methylene blue (MB) is added (Fang et al., 2009),(Patel et al., 2010).

In the electrochemical measurement, square wave voltammeteries (SWV) of MB-DNA are performed. Due to the intercalation of MB in dsDNA, the concentration of free MB in solution decreases, so the SWV peak current decreases as dsDNA concentration is increased. By defining a threshold function, based on the current signals obtained by SWV, it is possible to quantify the DNA concentration in the sample. For these SWV measurements, RNase P Positive Control Ultramer and MB diluted in PBS were used. In the graph below, experimental data of the measured peak intensity of MB as the DNA concentration in solution is changed is shown.



From the obtained data, it is concluded that our electrochemical detection system is able to detect DNA concentrations above 4ng/μl. The range of applications of this LOC system is wide, since it is not specific for just one specific analyte. Additionally, the inexpensive and simple fabrication method of this system enables its mass fabrication.

Ruano-López, J.M., Laouenan, F., Agirregabiria, M., Azkarraga, V., Berganzo, J., Mayora, K., Imaginenano NanoBio&Med, Bilbao Exhibition Centre, April 11-14, 2011.

Fang, T.H., Ramalingam, N., Xian-Dui, D., Ngin, T.S., Xianting, Z., Lai Kuan, A.T., Peng Huat, E.Y., Hai-Qing, G. 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2131-2136.

Patel, M.K., Solanki, P.R., Kumar, A., Khare, S., Gupta, S., Malhotra, B.D. 2010. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2586-2591.

Euroensors 2012

Development an integration of an electrochemical system in a LOC device for DNA detection

Z.Herrasti¹, I.Etxabe¹, J.M.Mitxelena¹, M.P.Martínez¹, J.M.Ruano-López¹, J.Elizalde¹,
F.Martínez¹

¹*IK4-Ikerlan, Mondragón, Spain*

Summary

In this work we have developed an electrochemical detection system (EDS), with the aim to simplify and reduce the cost of a Lab on a Chip (LOC) device [1] in the case of qualitative DNA detection measurements. For that, in addition to the optical detection system of the LOC device an EDS is added.

The LOC system consists of a portable platform reader-actuator and a disposable Labcard capable of performing nucleic acid concentration and amplification. The sample is injected in the labcard and, after the elution of the DNA, it is transferred to the PCR chamber, where the DNA is amplified and transferred to the detection chamber. In this chamber an electrochemical sensor is integrated.

In addition, a potentiostat/galvanostat which is integrated in the LOC system is developed for the electrochemical measurements.

Motivation and results

The main objective of this work is to develop a low cost system with integrated electrodes and electronics [2], which improves the signal to noise ratio of the electrochemical sensor.

For the integration of the sensor in the electrochemical detection chamber, gold and platinum electrodes are deposited by sputtering on COC (cycloolefin copolymer), achieving a total integration of the electrodes in the microfluidic cartridge.

The electrochemical module consists of three main parts: impedance matching, current measurement and error signal amplification, Fig. 1.

Across the impedance matching module, input impedance higher than $82\text{G}\Omega$ is achieved by making a guarding of the input signal, that will therefore decrease the error with respect to the applied reference voltage.

The current measurement module allows to perform a configuration with single or double power supply mode. If the currents that are going to be measured in the application are higher than 100nA , the single power supply mode is used for cost reduction.

The performed system has a high input impedance and is able to measure with a resolution better than 8nA in the $\pm 1\mu\text{A}$ current range.

In order to integrate all the electronics of the system, the control electronics of the processing unit of the LOC is used for the cartridge control and the hardware which is required for the electrochemical sensor.

The developed electrochemical system is tested and compared to a commercial AUTOLAB PGSTAT, obtaining identical results in the performed tests. The main application of the EDS is to measure different concentrations of DNA after the amplification in the PCR chamber [3]. For that, square wave voltammeteries (SWVs) of solutions of Methylene Blue (MB) with different concentrations of DNA are measured. In Fig. 2, SWVs of dilutions of PCR products are shown, where the sensor is able to distinguish between different concentrations of DNA. The detection limit of the EDS is of $4\text{ng}/\mu\text{l}$ DNA and taking into account that the measured solutions in the system are previously amplified, this detection limit is lower than the detection limit needed for the LOC device [4]. Finally, different tests are made to see the repeatability of the measurements Fig. 3, where the mean values and the obtained highest and lowest peak currents are shown.

References

- [1] J.M. Ruano-López, F.Laouenan, M.Agirregabiria, V.Azkarraga, J.Berganzo, K.Mayora, Imaginenano NanoBio&Med, Bilbao Exhibition Centre, April 11-14, 2011.
- [2] S.Schumacer, J.Nestler, T.Otto, M.Wegener, E.Ehrentreich-Förster, D.Michel, K.Wunderlich, S.Palzer, K.Sohn, A.Weber, M.Burgard, A.Grzeiak, A.Teichert, A.Brandenburg, B.Koger, J.Albers, E.Nebing, F.F.Bier, *Highly integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis*, Lab Chip 12 (2012) 464-473.
- [3] J.M.Ruano-López, M.Agirregabiria, G.Olabarria, D.Verdooy, D.D.Bang, M.Bu, A.Wolff, A.Voigt, J.A.Dziuban, R.Walczak, J.Berganzo. *The SmartBioPhone™, a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL*, Lab Chip 9 (2009) 1495-1499.
- [4] C.S.J.Hou, N.Milovic, M.Godin, P.R.Russo, R. Chakrabarti, S.R. Manalis, *Label-free microelectronic PCR amplification*, Anal.Chem. 78 (2006) 2526-2531.

Word count: 499

Corresponding Author: Zorione Herrasti, IK4-Ikerlan, Pl.J.ML Arizmendiarieta 2, 20500 Arrasate, Spain. Phone: +34 943712400; Fax: +34 943796944; E-mail: zherrasti@ikerlan.es

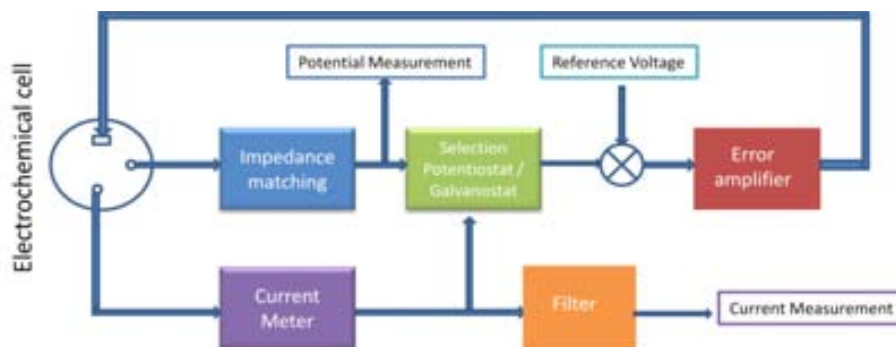


Fig. 1: Potentiostat/Galvanostat design. Block diagram.

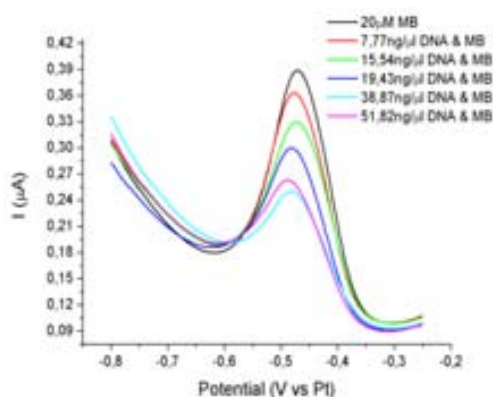


Fig. 2: SWV measurements of solutions of MB with different concentrations of DNA.

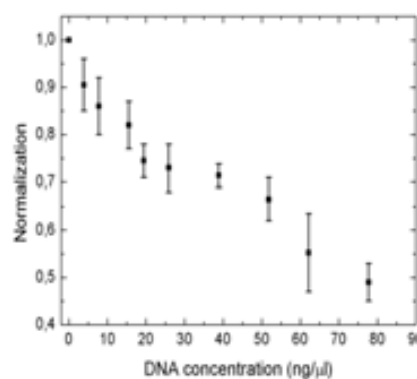


Fig. 3: Deviation curve for different concentrations of DNA, where the mean values and the highest and the lowest currents are shown in measurements carried out in different sensors.

Biosensing 2013

Electrochemical Biosensors Based on Magnetic Particle Surface Shadowing and CNT Wiring

Z. Herrasti^{*1}, R. Olivé-Monllau², FX. Muñoz-Pascual², F. Martínez¹, E. Baldrich²

¹IK4-IKERLAN Technological Research Centre, Spain; ²Institut de microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC), Spain

zherrasti@ikerlan.es

It has been shown that, in aqueous solution, carbon nanotubes (CNT) do readily self-assemble onto the surface of magnetic microparticles (MP)¹⁻⁴. Layering of such CNT/MP composites using a magnet has been successfully exploited for the fast, simple and reversible production of CNT-electrodes¹. Besides, since magnetically entrapped CNT act as electrical wires that interconnect MP between them and with the electrode surface, CNT wiring allows also the electrochemical sensing of the MP surface, which has been applied to the straightforward immunosensing of electroactive targets⁵. Here, we demonstrate the usefulness of CNT magnetic entrapment as a versatile biosensing strategy for detection of non-electroactive targets as well.

In this work, the procedure for CNT magnetic entrapment has been extensively characterized and optimized. Among others, CNT suspensions of enhanced stability have been produced, the conditions for CNT efficient self-assembly onto MP of different sizes and types have been determined, and performance of the CNT-electrodes produced has been studied electrochemically in order to improve the reproducibility and sensitivity of the method.

For immunosensor development, MPs have been simultaneously conjugated with antibodies and with an electroactive label. When the antibody-antigen reaction takes place on the MP, the electroactive labels in that fraction of the MP surface are physically shadowed/sheltered. This results in a detectable decrease of the oxidation peak current attributed to the label, measured by voltammetry. As it is shown, detection by CNT wiring enhances ten-fold the electrochemical currents registered compared to detection of the MP alone. Furthermore, following detection, CNT/MP can be released by removing the magnet and the electrode can be easily reused. As a proof of concept, detection of detergents and proteins is accomplished.

References:

1. Baldrich, E., et al., Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: Application to dopamine detection. *Biosens. Bioelectron.* (2011) 26:1876-1882
2. Fang, F.F. and H.J. Choi, Fabrication of multiwalled carbon nanotube-wrapped magnetic carbonyl iron microspheres and their magnetorheology. *Colloid Polym. Sci.* (2010) 288:79-84
3. Liu, Y.D. and H.J. Choi, Carbon nanotube-coated silicated soft magnetic carbonyl iron microspheres and their magnetorheology. *J. Appl. Phys.* (2012) 111(7)
4. Tong, G., et al., Enhanced electromagnetic characteristics of carbon nanotubes/carbonyl iron powders complex absorbers in 2-18 GHz ranges. *J. Alloys Compd.* (2011) 509: 451-456
5. Baldrich, E. and F.X. Muñoz, Carbon nanotube wiring: A tool for straightforward electrochemical biosensing at magnetic particles. *Anal. Chem.* (2011) 83:9244-9250

Acknowledgements: This work was funded by Project DPS2008-07005-C02-02 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

Euroensors 2014

CNT wiring for signal amplification in electrochemical magnetosensors

Z. Herrasti¹, F. Martínez¹, E. Baldrich²

¹*IK4-Ikerlan Technological Research Centre, 20500 Mondragón, Spain*

²*Diagnostic Nanotools. Cibbim-Nanomedicine. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona. Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain*

Summary

Magnetic particles (MPs) are useful tools for analyte binding and concentration, which has been extensively exploited for the development of electrochemical magnetosensors. Here, after binding and washing, MP are wrapped with carbon nanotubes (CNT) and layered onto an electrode. In this way, CNT wiring provides signal amplification in subsequent electrochemical detection. We demonstrate this approach by accomplishing dopamine detection and myeloperoxidase (MPO) enzymatic activity monitoring. For dopamine detection, dopamine is electrostatically bound using streptavidin-MP. The assay takes 45 minutes, displays LOD of 2 nM in PBS, exhibits no interference from uric acid and ascorbic acid, and can be operated in diluted urine. For MPO enzymatic activity monitoring, immunofunctionalized MPs and commercially available tetramethylbenzidine-based (TMB) enzymatic substrate are used. The optimized assay takes 30 minutes and yields LODs of 6 and 55 ng mL⁻¹ in PBS and undiluted human serum, respectively.

Motivation and results

The special properties of MPs and CNTs are exploited in this detection procedure. Analyte capture and concentration from the sample are first performed with MPs. CNTs are then wired to the MPs surface [1, 2] to enhance the sensitivity of the successive electrochemical detection. The validity of this approach is demonstrated by detecting two analytes of clinical interest, dopamine and MPO.

DA is an electroactive neurotransmitter whose abnormal production is associated with a number of neurological and neurodegenerative disorders. Here, capture and concentration of dopamine from the sample is based on electrostatic attraction between positively charged dopamine and negatively charged streptavidin-coated MPs (1 μm ϕ) at pH=7. Under these conditions, potential interferents such as uric acid and ascorbic acid are repelled. Following washing, bare and CNT-wrapped MP are layered onto a carbon screen printed electrode (C-SPE) and cyclic voltammetry is performed for straightforward electrochemical detection of bound dopamine (Figure 1). CNT wiring systematically resulted in higher signals and enabled detection of lower dopamine concentrations (Figure 2). The assay showed linear response versus the logarithm of dopamine concentration between 0.1-5 μM, signal saturation above 50 μM, LOD of 2 nM in saline solution, and could be operated in diluted urine human samples (Figure 3).

MPO is a cardiovascular biomarker and a sensitive predictor of myocardial infarction. In this work, detection is founded on MPO specific capture from the sample using immunofunctionalized MPs and chronoamperometric detection of MPO endogenous peroxidase activity using a ready-to-use TMB/H₂O₂ enzymatic substrate (Figure 4). If previous to detection MP were wrapped with increasing amounts of CNT, higher signals and lower LOD were generated (Figure 5). The optimized assay could be performed in human serum diluted 1:10 and displayed an LOD of 5.43 ng mL⁻¹, which is equivalent to 54.3 ng mL⁻¹ in undiluted serum (Figure 6). In view of these results, the current assay would allow discrimination between healthy individuals (<90 ng mL⁻¹) and patients at risk of suffering a cardiovascular event (>350 ng mL⁻¹) using cheap and disposable C-SPE and commercially available MP and ready-to-use enzyme substrate.

In the two assay set-ups, CNT wiring provided efficient signal amplification.

References

- [1] R. Olivé-Monllau, F.X. Muñoz-Pascual, E. Baldrich, Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: Application to paracetamol detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185(2013) 685-93.
- [2] Z. Herrasti, R. Olivé-Monllau, F.X. Muñoz-Pascual, F. Martínez, E. Baldrich, Electrochemical biosensing of non-electroactive targets using ferrocene-labeled magnetic particles and CNT wiring, *Analyst*, 139(2014) 1334-9.

Word count: 492

Corresponding author: Eva Baldrich. Diagnostic Nanotools. Cibbim-Nanomedicine. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. (+34)934893000. Eva.baldrich@vhir.org.

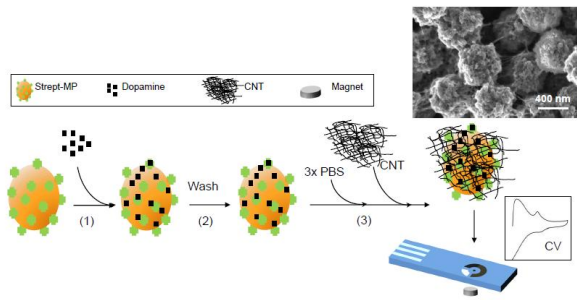


Fig. 1: Scheme of the assay procedure for dopamine detection and SEM image of CNT-wrapped MP.

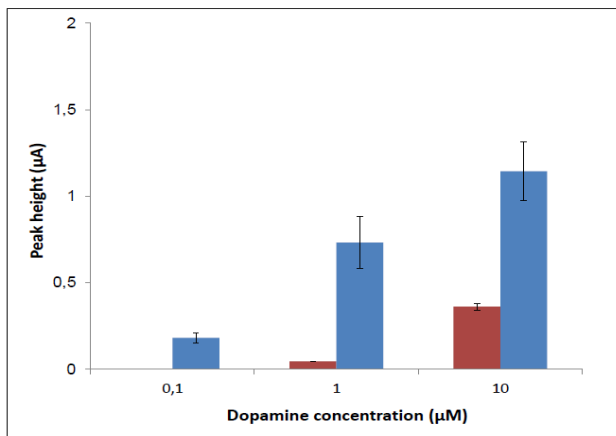


Fig. 2: Electrochemical detection of increasing concentrations of dopamine using C-SPE. (Red bars) dopamine in solution. (Blue bars) dopamine after incubation with MP, wiring with CNT and magnetic entrapment of the MP/SWCNT complexes onto the working electrode.

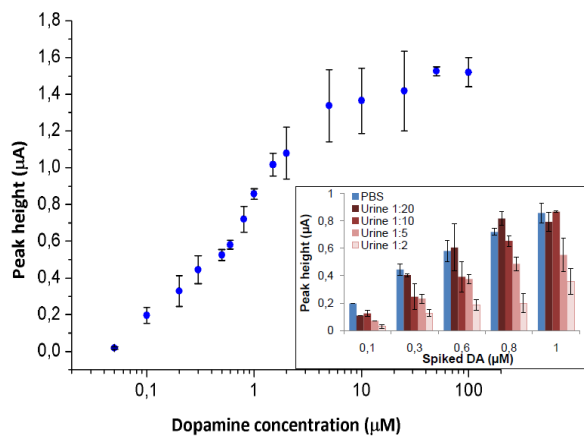


Fig. 3 Calibration plot obtained for different concentrations of dopamine in PBS. (Insert) Peaks obtained for different concentrations of dopamine in PBS and in different dilutions of urine.

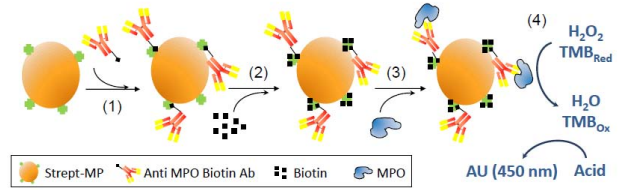


Fig. 4: Scheme illustrating MP-antiMPO production and performance of the MPO detection assay.

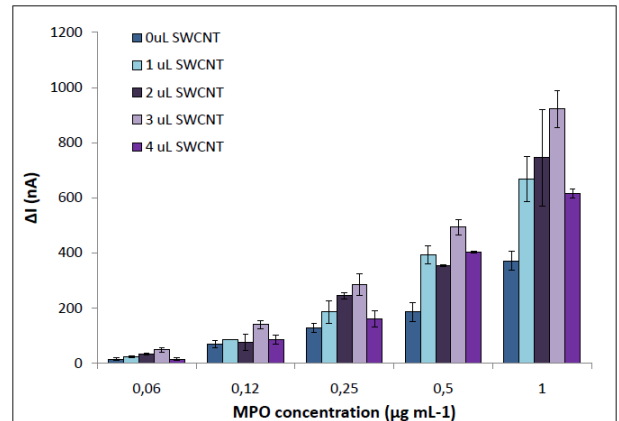


Fig. 5: Signals produced by increasing concentrations of MPO after classical detection or detection by CNT wiring using different amounts of CNT.

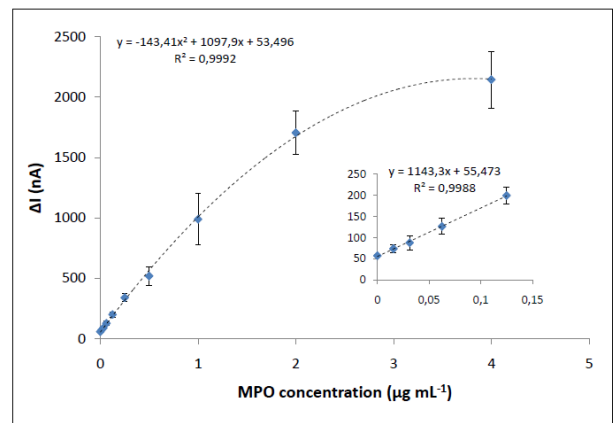


Fig. 6: Calibration graph of signals produced by increasing concentrations of MPO using 3 µL SWCNT and TMB enzymatic substrate. (Insert) Partial amplification of the main graph.