

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Ciencias Médicas Básicas



Universidad
de La Laguna

**IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE
BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS EN EL
ÁMBITO BIOMÉDICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miriam Isabel Martín Hernández

Bajo la dirección del

Prof. José Luis González Mora y Dr. Pedro Ángel Salazar Carballo

La Laguna, 2015

José Luis González Mora, profesor titular de Fisiología de la Universidad de La Laguna (ULL) y **Pedro Ángel Salazar Carballo**, investigador contratado-doctor del Instituto de Ciencias Materiales de Sevilla (CSIC-Univ. Sevilla), como directores del trabajo presentado en esta Memoria.

CERTIFICAN: Que la memoria titulada “IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS EN EL ÁMBITO BIOMÉDICO” ha sido realizada por la Licenciada en Química **Miriam Isabel Martín Hernández**, bajo nuestra dirección, en el departamento de Ciencias de la Salud de la ULL y constituye un trabajo original de investigación.

AUTORIZAN: La defensa de la presente Memoria, dado que reúne los requisitos de calidad y cantidad necesarios para defender la Tesis Doctoral por compendio de artículos para optar al **Grado de Doctor** por la Universidad de la Laguna en el Programa de Investigación Biomédica Básica.

La Laguna, Julio de 2015

José Luis González Mora

Fdo.:

Sevilla, Julio de 2015

Pedro Ángel Salazar Carballo

Fdo.:

Agradecimientos

Hay tantas cosas que AGRADECER.

Todo siempre empieza con una ilusión. Con la ilusión de querer ser alguien, con la ilusión de creer en algo, con la ilusión de querer formar parte de algo y en este sentido comencé un camino que inicialmente tenía una marcada orientación laboral y terminó siendo básicamente satisfacción personal. Desde que emprendí esta aventura y hasta el día de hoy ha pasado mucho tiempo, más del que me hubiera gustado, pero he de reconocer que he intentado aprovechar, disfrutar y utilizar cada una de las cosas que me han sido proporcionadas durante el transcurso de esta etapa.

Quiero empezar agradeciendo a mi familia la posibilidad de haber realizado esta Tesis ya que sin ellos, no habría podido haber llegado hasta aquí.

Le doy las gracias de manera muy especial a mi madre por haberme ofrecido la gran oportunidad de volver a retomar mis estudios. Te estaré eternamente agradecida por animarme a emprender un camino donde el saber, el aprender, el descubrir y el comprender, a la larga, se han convertido en mi forma de vida.

A mis padres Agustín y Ángeles, les agradezco el esfuerzo que tuvieron que realizar para poderme permitir seguir en el camino que me ha conducido hasta aquí. Les agradezco de manera muy cariñosa que se hayan sentido tan orgullosos de cada uno de los pasos que iba dando, por pequeño que fuese. “Gracias por ayudarme a ser la persona que soy”

Hay una persona muy importante para mí que siempre ha estado dispuesta a apoyarme, ayudarme, valorarme y quererme por encima de todo. Cuando pienso en mi trayectoria ella siempre está presente. Mi abuela Paulina, ha sido una de las personas claves en esta etapa de mi vida. Siempre había una palabra de ánimo, un reconocimiento al esfuerzo realizado y un cariño que me ayudaban a seguir adelante. Te doy las gracias por haberme ofrecido tanto apoyo y por haberte encontrado siempre que te necesitaba. “Gracias por hacerme sentir tan especial”

A mi abuelo Antonio, esa persona luchadora, trabajadora y honrada le agradezco haberme enseñado tantos valores y sobre todo que el esfuerzo, sacrificio y dedicación siempre tienen su recompensa, aunque a día de hoy, no consiga vislumbrarla con total claridad. “Te echo mucho de menos”

A mi hermana Ángeles le agradezco la voluntad y el apoyo que siempre me ha mostrado por ayudarme a seguir adelante. “Sé que estas”.

A mi hermana Aida le agradezco toda la ayuda que me ha ofrecido, pero sobre todo, que además de ser una hermana haya sido y siga siendo la amiga que nunca falla. Siempre he sentido un apoyo absoluto por su parte. “Agradezco mucho tenerte, me da tranquilidad”.

A mi otra hermanita, Isa, gracias por compartir tantos momentos geniales contigo. Eres una persona excelente. “Te mereces lo mejor”.

Gracias a Javier por aportarme más que una amistad llena de cariño y complicidad. “Siempre serás mi hermanito”.

A mis sobrinos/as, Yazmina, Erika, Jezabel, Jonathan, Aroha y Kevin, les agradezco que me hayáis hecho y me sigáis haciendo sentir tan feliz. “Sois un aporte de energía enorme”.

A mis hijos Aydam y Nayma les agradezco que con su llegada me hayan convertido en una persona más feliz, más fuerte, más centrada, en una persona dispuesta a afrontar la vida disfrutándola y sacrificándola en los momentos en los que sea necesario sin ningún tipo de remordimiento. Sois la alegría de mi vida, mi sistema de prioridades, mis ejes de referencia. Agradezco el equilibrio, felicidad y estabilidad que me habéis proporcionado. “Os quiero, gracias por llegar a mi vida”

Pero si hay alguien al que realmente le deba un profundo agradecimiento por la realización de esta tesis ese es con diferencia a mi marido. Ni con todos los agradecimientos del mundo podría conseguir expresar lo que ha significado para mí el tenerte a mi lado. El apoyo incondicional, el entusiasmo por la investigación en momentos en los que a mí ya me fallaba. Son tantas y tantas cosas, unas que se podrían expresar y otras que se mantendrán en mi alma para siempre que no acabaría nunca. Terminaré con unas palabras que aunque sencillas reflejan todo lo que pienso y siento. “Gracias, sin ti no hubiera sido posible”.

Me gustaría agradecerles a mis directores de Tesis José Luis González Mora y Pedro Ángel Salazar Carballo todo el esfuerzo y dedicación puestos en este trabajo.

A José Luis le agradezco la forma en la que me animó a dar el salto de química a medicina, el haber contado conmigo para su equipo de investigación, las veces en las que me dio un baño de realidad, los consejos que me proporcionó y el tiempo que me dedicó. “Gracias por todo”.

A Pedro Salazar le agradezco el acierto en la línea de investigación, todas y cada una de las directrices proporcionadas, las innumerables revisiones realizadas, todo el tiempo dedicado y en definitiva la excelente dirección de este trabajo. “Gracias por ayudarme tanto”

También me gustaría agradecerles a todos los compañeros del laboratorio de Neuroquímica y Neuroimagen de la ULL, así como a otros miembros de la ULL (Pablo Lorenzo Luis, Alberto Hernández Creus y Alejandro Orive) y colaboradores de la Universidad Complutense de Madrid (Susana Campuzano, Reynaldo Villalonga y José Manuel Pingarrón) por participar en las publicaciones que contiene la presente tesis.

Gracias a María Jesús (Departamento de Analítica) por ser mi directora de Máster, por los consejos ofrecidos y por el cariño recibido. “Eres una gran persona”.

Por último, me gustaría agradecerles a todos y cada uno de los/las amigos/as que han compartido conmigo este viaje o parte de él. Me quedo con muchísimos momentos especiales para guardar y disfrutar en mi memoria. “Gracias por haber formado parte de mi vida”.

Resumen

En la presente memoria de tesis doctoral se han desarrollado biosensores nanoestructurados basados en el empleo de nanopartículas magnéticas (NPMs) modificadas con polidopamina (pDA). Los procesos de síntesis, modificación y construcción de los dispositivos electroquímicos han sido evaluados convenientemente y han permitido valorar la eficiencia y la aplicabilidad de los dispositivos ensayados.

El método de síntesis de las NPMs empleado (co-precipitación química a partir de una disolución de sales de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en condiciones alcalinas) ha resultado ser un método conveniente y adecuado para la síntesis de las NPMs. La simplicidad del método de síntesis y la capacidad de preparar gran cantidad de NPMs ha resultado beneficiosa para el desarrollo de esta tesis. El tamaño, estructura, comportamiento magnético y composición de fase de las NPMs ha podido ser estudiado mediante técnicas de caracterización de materiales, tales como: SEM, TEM, XPS, XRD, AFM, análisis térmico, estudio de la susceptibilidad magnética, técnicas espectroscópicas, etc.

La polimerización de la polidopamina se ha realizado introduciendo una cierta cantidad de NPMs en una disolución de dopamina en condiciones ligeramente alcalinas dando una configuración híbrida tipo *core-shell* (núcleo-cáscara): NPMs@pDA. La derivatización y composición de las NPMs modificadas fue estudiada mediante las técnicas instrumentales anteriormente comentadas. Se ha prestado especial atención al tiempo de polimerización que afecta al grosor de la capa polimérica y al estado de oxidación de la misma. De este modo se ha demostrado que mediante un proceso de oxidación térmica es posible incrementar cantidad de grupos reactivos (quinonas) en la superficie del polímero e incrementar la cantidad de material retenido en superficie.

Las NPM@pDA se han utilizado como sustrato de inmovilización de material biológico (enzimas y anticuerpo) y se han empleado en el desarrollo de biosensores enzimáticos amperométricos de primera y segunda generación para detectar peróxido de hidrógeno, glucosa y compuestos fenólicos. A su vez, han sido empleadas como magnetoinmunoplateformas para la determinación de *Legionella pneumophila*.

El beneficio del empleo de superficies nanoestructuras modificadas con polidopamina ha quedado demostrado al estudiar diferentes configuraciones y los principales parámetros, cinéticos, electroquímicos, y analíticos. Los cálculos de la relación señal/ruido, sensibilidad, selectividad, intervalos de linealidad y los límites de detección y cuantificación para los compuestos estudiados han demostrado la aplicabilidad de los dispositivos ensayados.

Finalmente, se ha estudiado la respuesta de los biosensores desarrollados en condiciones próximas a las reales, prestando especial atención a los fenómenos de interferencia, y comparando los resultados con métodos estándares.

Abstract

Herein dissertation nanostructured biosensors, based on poly(dopamine)-modified magnetic nanoparticles (MNPs@pDA), have been developed. Synthesis, modification and construction of biosensors have been evaluated. The efficiency and applicability of the devices were tested. Chemical co-precipitation from $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ solution (2:1) (under alkaline conditions) has proved a convenient and suitable method for obtaining MNPs. The simplicity of the method of synthesis and the ability to prepare lots of MNPs has been beneficial to the development of this thesis. The size, structure, magnetic behavior and phase composition have been studied using different techniques such as SEM, TEM, XPS, XRD, AFM, thermal analysis, magnetic susceptibility, etc. The polymerization of poly(dopamine) was performed introducing a certain amount of MNPs in dopamine solution (in slightly alkaline conditions) giving a hybrid core-shell structure (MNPs@pDA). Derivatization and chemical composition of the modified-MNPs were studied too. Special attention was paid at the polymerization time and its effects on the polymer thickness. The oxidation state of the polymer was evaluated too. Thus, it was shown that thermal oxidation of the film can increase the number of reactive groups (quinones) on the surface of the polymer, and increase the amount of material retained on the surface of the MNPs@pDA. Modified-nanoparticles were used as substrate for immobilizing biological material (enzyme and antibody) and have been used to develop amperometric biosensors. Hydrogen peroxide, glucose and phenolic compounds were detected using the present approach. On the other hand, magneto-immunoplatfoms were developed to detect *Legionella pneumophila*. The benefit of using nanostructured materials has been demonstrated. The main experimental parameters, kinetic, electrochemical and analytical properties of each biosensor were

evaluated. Signal-to-noise ratio, sensitivity, selectivity, linearity ranges and limits of detection and quantification were obtained. We have studied the biosensor response under real conditions, paying special attention to interference phenomena and comparing the results with standard methods.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. MOTIVACIÓN | 1 |
| 1.1 Biosensores | 2 |
| 1.2 Transductores electroquímicos: sencillez y eficiencia | 4 |
| 1.3 Biosensores nanoestructurados | 4 |
| 1.4 Inmovilización del material biológico (polidopamina) | 6 |
| 2. OBJETIVO | 8 |
| 3. PLAN DE TRABAJO | 10 |
| 4. BIOSENSORES | 14 |
| 4.1 Definición | 15 |
| 4.2 Clasificación de los biosensores | 17 |
| 4.2.1 Clasificación en función del elemento de reconocimiento | 18 |
| 4.2.1.1 Biosensores biocatalíticos | 19 |
| 4.2.1.1.1 Biosensores enzimáticos | 19 |
| 4.2.1.2 Biosensores de bioafinidad | 24 |
| 4.2.1.2.1 Inmunosensores | 25 |
| 4.2.2 Clasificación en función del tipo de transductor | 29 |
| 4.2.2.1 Electroquímicos | 30 |
| 4.2.2.2 Mésicos, piezoeléctrico o acústicos | 30 |
| 4.2.2.3 Térmicos | 30 |
| 4.2.2.4 Ópticos | 31 |
| 4.3 Biosensores electroquímicos | 31 |
| 4.3.1 Biosensores Potenciométricos | 32 |
| 4.3.2 Biosensor Conductimétricos | 33 |
| 4.3.3 Biosensores Amperométricos | 33 |
| 4.3.3.1 Clasificación de biosensores amperométricos | 33 |

| | | |
|---|-------|----|
| 4.3.3.1.1 Biosensores de 1ª generación | | 34 |
| 4.3.3.1.2 Biosensores de 2ª generación | | 34 |
| 4.3.3.1.3 Biosensores de 3ª generación | | 35 |
| 5. NANOTECNOLOGÍA | | 37 |
| 5.1 Nanotecnología | | 38 |
| 5.2 Nanopartículas | | 39 |
| 5.3 Nanopartículas magnéticas (NPMs) | | 40 |
| 5.3.1 Diamagnetismo | | 42 |
| 5.3.2 Paramagnetismo | | 43 |
| 5.3.3 Orden magnético colectivo: Interacción de intercambio y superintercambio | | 43 |
| 5.3.3.1 Superparamagnetismo | | 45 |
| 5.4 Óxidos de hierro: Magnetita/Maghemita | | 48 |
| 5.5 Síntesis de nanopartículas magnéticas | | 49 |
| 5.5.1 Mecanismo de formación de nanopartículas magnéticas en fase líquida | | 51 |
| 5.5.2 Métodos Químicos de Síntesis | | 53 |
| 5.5.2.1 Co-precipitación | | 53 |
| 5.5.2.2 Coprecipitación química por inyección rápida | | 56 |
| 5.5.2.3 Coprecipitación química en condiciones de reflujo y envejecimiento | | 57 |
| 5.5.2.4 Micelas inversas y micro-emulsión | | 57 |
| 5.5.2.5 Termólisis | | 58 |
| 5.5.2.6 Reacción hidrotermal | | 58 |
| 5.6 Funcionalización y estabilidad de las NPMs | | 59 |
| 5.7 Bioconjugación o biofuncionalización | | 60 |
| 6. POLIDOPAMINA | | 62 |
| 6.1 Introducción | | 63 |
| 6.2 Dopamina | | 64 |
| 6.3 Ventajas y aplicaciones de la polidopamina | | 64 |

| | |
|--|-----|
| 6.4 Síntesis de polidopamina | 65 |
| 6.5 Mecanismo de polimerización | 66 |
| 6.6 Aplicación de polidopamina en el desarrollo de biosensores: inmovilización de enzimas y anticuerpos | 70 |
| 6.6.1 Base de Schiff | 70 |
| 6.6.2 Adiciones tipo Michael | 71 |
| 6.7 Conclusiones | 71 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 74 |
| 7.1 Materiales | 75 |
| 7.2 Métodos de caracterización de Materiales | 76 |
| 7.2.1 Voltamperometría | 76 |
| 7.2.1.1 Procesos farádicos y no farádicos | 77 |
| 7.2.1.2 Fenómenos de transporte transferencia de masa | 78 |
| 7.2.1.3 Transferencia electrónica | 79 |
| 7.2.2 Técnicas voltamperométricas | 80 |
| 7.2.2.1 Voltamperometría a potencial constante | 80 |
| 7.2.2.2 Voltamperometría cíclica | 81 |
| 7.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 83 |
| 7.2.4 Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) | 85 |
| 7.2.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) | 87 |
| 7.2.6 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS) | 90 |
| 7.2.7 Difracción de Rayos X (XRD) | 93 |
| 7.2.8 Espectroscopía Visible-Ultravioleta, Infrarroja y Raman | 96 |
| 7.2.8.1 Espectroscopía Visible-Ultravioleta (Vis-UV) | 96 |
| 7.2.8.2 Espectroscopía Infrarroja (IR) | 98 |
| 7.2.8.2.1 Bandas activas en infrarrojo | 100 |
| 7.2.8.3 Espectroscopía Raman | 100 |
| 7.2.8.4 Espectroscopía Raman vs IR | 102 |

| | | |
|--|-------|-----|
| 7.2.9 Análisis térmico | | 102 |
| 7.2.9.1 TG | | 103 |
| 7.2.9.2 TDA | | 104 |
| 7.2.9.3 DSC | | 104 |
| 7.2.9.4 TDA vs DSC | | 105 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES | | 106 |
| 8.1 Preparación de nanopartículas magnéticas en configuración core-shell de magnetita (Fe ₃ O ₄) modificadas con polidopamina para la construcción de biosensores | | 107 |
| 8.2 Preparación de nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina enriquecida con grupos quinona: aplicación en biosensores. | | 112 |
| 8.3 Desarrollo de una magneto-inmuno-plataforma basada en nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina para la detección de Legionella pneumophila. | | 117 |
| 9. CONCLUSIONES | | 123 |
| REFERENCIAS | | 126 |
| APENDICE: Publicaciones | | 138 |

MOTIVACIÓN

1.1 Biosensores

Hoy en día, existe una gran demanda de dispositivos analíticos altamente selectivos y no invasivos en el ámbito de la salud, calidad ambiental y sector agroalimentario. En este contexto, los biosensores son dispositivos pequeños, económicos, robustos y portátiles, que permiten la cuantificación selectiva de analitos químicos y bioquímicos. Un biosensor es un dispositivo miniaturizado integrado que emplea un elemento biológico (anticuerpo, enzima, receptor de proteína, ácido nucleico, etc.) como elemento de reconocimiento acoplado a un transductor (óptico, electroquímico, piezoeléctrico, etc.) que convierte la señal biológica en una corriente manejable y mensurable. Los biosensores aprovechan la sinergia entre la alta selectividad de reconocimiento, existente entre el sustrato y el material biológico, con la potencia de procesamiento de la microelectrónica moderna, lo que los convierte en una poderosa herramienta en aplicaciones analíticas. Su éxito radica en la extremada sencillez de su manejo y bajo coste gracias a la posibilidad de su producción a gran escala. Finalmente, los biosensores son herramientas de gran utilidad en atención sanitaria, ya que pueden ser aplicados desde la prevención y el diagnóstico precoz de una enfermedad hasta el estudio de su progresión y seguimiento durante un tratamiento farmacológico.

El desarrollo de biosensores es un “hot topic” en bioanalítica, donde confluyen un gran número de disciplinas como: electroquímica, medicina, física, ciencias de materiales, electrónica, biología, etc., siendo un claro ejemplo de multidisciplinariedad. Finalmente, los biosensores han ido reemplazando técnicas más sofisticadas como los métodos cromatográficos y espectroscópicos ampliamente empleados en el ámbito sanitario, sobre todo debido al rápido diagnóstico y portabilidad de los dispositivos.

Debido a su especificidad, portabilidad, rápido tiempo de respuesta, bajo costo, fabricación a gran escala, etc., se pronostica que los biosensores jugarán un papel muy importante en aplicaciones analíticas en un futuro cercano. Así, la miniaturización, los diseños de bioarrays (que permiten realizar medidas multiparamétricas), el desarrollo de dispositivos microfluídicos (Lab-on-a-Chip) y la incorporación de materiales nanoestructurados han mejorado las perspectivas de futuro e incrementado el interés de la comunidad científica por estos dispositivos.

Sin lugar a dudas, los biosensores desarrollados para la detección de glucosa en sangre han recibido más atención que cualquier otro dispositivo debido a la importancia de la diabetes como problema de salud mundial, dando un impulso muy importante al desarrollo de este tipo de tecnología. En 2000 se estimó que alrededor de 171 millones de personas en el mundo eran diabéticos y que este valor llegaría a 370 millones en 2030. No es sorprendente, por lo tanto, que haya un gran número de dispositivos comerciales en manos de multinacionales farmacéuticas enfocados al control de los niveles de glucosa en pacientes con diabetes. Sin embargo, también es posible encontrar biosensores comerciales para otros metabolitos, tales como, colesterol, lactato, urea, creatina, ácido úrico, ácido ascórbico, colina y glutamato, relacionados con las nuevas cuestiones de salud, aunque estos no se encuentran fácilmente disponibles en la farmacia.

Existen numerosos trabajos en detección de biosensores en los que se pretende mejorar la sensibilidad, selectividad o disminuir el potencial aplicado. Para ello, se han empleado diferentes mediadores, como la tionina, polímeros de Os como el $[\text{Os}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2](\text{PF}_6)_2$, polímeros de Ru, ferrocenos, sistemas nanoestructurados como nanopartículas de oro (GNPs), nanopartículas magnéticas (NPMs), nanotubos de carbono (CNT), grafeno y materiales electrocatalíticos como el Azul de Prussia.

1.2 Transductores electroquímicos: sencillez y eficiencia

El éxito de un biosensor depende en gran medida del tipo y calidad del transductor sobre el cual ocurre el proceso de detección. Hoy en día, existen biosensores sensibles y selectivo basados en plasmones resonantes superficiales (SPR), dispositivos piezoeléctricos etc. Sin embargo, estos dispositivos son complejos y presentan ciertas limitaciones analíticas. Por otro lado, las técnicas electroquímicas como la voltametría cíclica, cronoamperometría, voltametría de pulso diferencial, etc., son técnicas sencillas y pueden ser utilizadas de forma rápida y eficiente en la detección de gran diversidad de analitos. Los dispositivos electroquímicos (ej: potenciostatos) presentan ventajas en términos de tamaño, costo, límite de detección, tiempo de respuesta, estabilidad a largo plazo etc., y por consiguiente, estos dispositivos suelen ser elegidos para su utilización en una gran gama de aplicaciones biomédicas y ambientales.

1.3 Biosensores nanoestructurados

La nanotecnología es un área interdisciplinar dedicada al estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales nanoestructurados para su explotación, tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial. El empleo de nuevos materiales nanoestructuradas ha abierto la posibilidad de fabricación de sensores y biosensores electroquímicos con sensibilidades mejoradas y límites de detección más bajos. Estas mejoras se justifican debido a las propiedades asociadas a sus dimensiones a escala nanométrica, donde las propiedades superficiales del material destacan sobre las propiedades intrínsecas. Así, los sistemas nanoestructurados poseen propiedades superficiales, electrónicas y catalíticas únicas. Entre ellos, destacan las nanopartículas de oro por su capacidad para adsorber biomoléculas (enzimas, anticuerpo y cadenas de oligonucleótidos) conservando la actividad biológica. Este tipo de comportamiento no

suele ocurrir sobre materiales adsorbentes del tipo superficie metálica pulidas, debido probablemente a la mayor libertad de orientación que poseen las biomoléculas inmovilizadas sobre los sistemas nanoestructurados. Por otro lado, los nanomateriales presentan una elevada relación superficie/volumen lo que proporciona una gran superficie disponible que permite incrementar la cantidad de material biológico inmovilizado. Finalmente, el empleo de sistemas nanoestructurados hace posible la transferencia de carga directa entre el grupo redox de las proteínas y la superficie del electrodo, permitiendo así, el desarrollo de biosensores de tercera generación. Muchos sistemas nanoestructurados son capaces de catalizar procesos redox de moléculas de interés del tipo peróxido de hidrógeno, oxígeno o NADH. Estas moléculas participan en reacciones bioquímicas útiles desde el punto de vista analítico, por lo tanto, son empleados en biosensores de primera y segunda generación para transducir las reacciones enzimáticas en la superficie de los transductores electroquímicos. Hay que destacar que tanto el tamaño como la morfología de las nanopartículas de los sistemas nanoestructurados suelen estar controlados y que suelen ejercer una gran influencia en la respuesta y sensibilidad de los dispositivos sensores construidos a partir de ellos.

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) resultan especialmente interesantes en ámbitos tan diversos como: biomédico, analítico, ciencia de los materiales, etc., debido a que pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo y empleadas en procesos de separación y concentración, mejorando la selectividad, sensibilidad y límites de detección obtenidos por otras aproximaciones. Además, existe una amplia gama de materiales, tanto orgánicos como inorgánicos, con los que se pueden crear configuraciones tipo *core-shell* (núcleo-cáscara) con la finalidad de generar posteriores modificaciones. Por otra parte, la gran superficie específica de los sistemas nanoestructurados y la excelente biocompatibilidad de los óxidos de hierro han

permitido mejorar el límite de detección en el ámbito de los biosensores. El fin último de la utilización de estos nanomateriales en el desarrollo de biosensores es la combinación de su gran área superficial con la preservación de la integridad estructural de las biomoléculas y el mantenimiento de su actividad biocatalítica permitiendo así, desarrollar dispositivos sensores con mejores prestaciones analíticas (sensibilidad, límites de detección,...).

1.4 Inmovilización del material biológico (polidopamina)

La correcta inmovilización del material biológico es esencial para optimizar el funcionamiento de un biosensor. Es por ello, que en las últimas décadas se han invertido muchos esfuerzos para conseguir métodos de inmovilización menos agresivos y eficaces que permitan retener el material biológico en condiciones óptimas de trabajo. El objetivo de la inmovilización es favorecer un contacto íntimo entre el biorreceptor y el transductor. El componente biológico de un biosensor tiene que ser incorporado en el dispositivo de manera que no se altere su actividad si posee propiedades catalíticas, o bien, que el sitio de unión en el que se produce la interacción con el analito se encuentre accesible al mismo (genosensores, inmunosensores). La inmovilización puede realizarse mediante métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o atrapamiento, y métodos químicos, mediante la formación de enlaces covalentes, capas intermedias (afinidad) o entrecruzamiento (*crosslinking*) entre otros.

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se pueden destacar (1) aumento de la estabilidad de la enzima; (2) posibilidad de reutilización del biosensor; (3) disminución de costes de proceso derivados de la reutilización del biosensor y (4) posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Por el contrario, los principales inconvenientes

del proceso de inmovilización son: (1) alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo; (2) gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte; (3) pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización.

Desde el punto de vista electroquímico, la *polidopamina* ofrece un microentorno adecuado para la inmovilización de una gran densidad de biomoléculas sobre la superficie sensora. De este modo, el material queda firmemente anclado mediante un enlace covalente que permite conservar su estructura tridimensional y actividad biológica (reconocimiento anticuerpo-antígeno, reacción enzima-sustrato). Aunque la estructura de este polímero (derivado de la dopamina (DA) y muy similar a la eumelanina) no ha sido dilucidada todavía, es probable que se forme por la reacción de las aminas primaria y los grupos quinonas (altamente reactivos) resultantes de la oxidación de los grupos catecoles producidos por la oxidación de la DA en presencia de oxígeno. Finalmente, la presencia de grupos quinona residuales sobre la estructura del polímero permite la formación de bases de *Schiff* y adiciones tipo *Michael* entre la superficie del polímero y el material biológico, lo que a su vez, permite la funcionalización del transductor de manera conveniente.

Durante los primeros años de investigación el principal interés de la comunidad científica en la dopamina fueron sus propiedades adhesivas y la posibilidad de modificación de un gran número de superficies de origen orgánico e inorgánico. Sin embargo, poco a poco y gracias al estudio detallado de sus propiedades físico-químicas se han descubierto nuevas propiedades y aplicaciones de gran interés. Hoy en día, el número de aplicaciones es enorme pese no ha pasado una década desde que fue presentada a la comunidad científica.

OBJETIVO

El *objetivo* principal de la presente tesis doctoral es utilizar las ventajas proporcionadas por las superficies electrónicas nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos con características analíticas mejoradas para su aplicación en el ámbito biomédico.

Como punto de partida se ha seleccionado el empleo de nanopartículas magnéticas como sustrato sobre el cual se inmovilizará el material biológico (enzimas y anticuerpos). El sistema de inmovilización planteado está basado en el empleo de un polímero *bioinspirado* como la polidopamina, el cual permitirá formar enlaces covalentes con los restos aminos del material biológico y realizar una adecuada inmovilización y transducción de la señal biológica con el transductor electroquímico (electrodos de carbón vitrificados y tarjetas serigrafiadas). También se emplearán materiales electrocatalíticos y mediadores electroquímicos que permitan disminuir el potencial de detección y la contribución de posibles interferentes de origen biológico.

PLAN DE TRABAJO

El *plan de trabajo* desarrollado para alcanzar el objetivo fijado en esta tesis consta de las siguientes etapas:

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas mediante co-precipitación química.

El método de síntesis de NPMs elegido ha sido la co-precipitación química por tratarse de un método sencillo, eficiente y de fácil escalado a partir de una disolución de sales de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en condiciones alcalinas. Con objeto de evaluar la composición de fase, tamaño y propiedades magnéticas de las NPMs sintetizadas se realizarán varios estudios empleando técnicas de caracterización de materiales como: microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), difracción de rayos X (XRD), análisis térmico (TG, TDA, DSC), espectroscopía (Vis-UV, IR, Raman), etc.

2. Modificación de las nanopartículas magnéticas con polidopamina y evaluación de las propiedades de inmovilización del material biológico.

Hoy en día, el empleo de NPMs modificadas con polidopamina, en el ámbito de los biosensores, es una aplicación novedosa. Con el objetivo de evaluar los procesos de modificación y derivatización serán estudiadas las condiciones de síntesis e inmovilización del material biológico en superficie. A su vez, se evaluará la actividad enzimática después de su inmovilización y la estabilidad temporal de la actividad catalítica. Además, se propone un método de modificación post-síntesis que permitirá incrementar la cantidad de grupos quinona en superficie y la cantidad de material biológico inmovilizado.

3. Desarrollo de biosensores amperométricos enzimáticos e inmunosensores para la determinación de peróxido de hidrógeno, glucosa, compuestos fenólicos y *Legionella Neumophila*.

Con el fin de desarrollar biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación de peróxido de hidrógeno, glucosa, compuestos fenólicos y *Legionella Neumophila*, serán empleadas diferentes superficies electródicas.

Se desarrollarán biosensores e inmunosensores usando como transductores electrodos de carbono vitrificado modificado y tarjetas serigrafiadas comerciales (SPCE). También se emplearán materiales electrocatalíticos, como el azul de Prusia (en biosensores de primera generación) o mediadores redox (hidroquinona, en biosensores de segunda generación), que reduzcan los potenciales de trabajo. En ambos casos se optimizarán las variables experimentales que afecten tanto a la modificación de la superficie electródica como a la respuesta amperométrica. Asimismo, se calcularán los parámetros cinéticos de la reacción enzimática sobre las superficies de los biosensores y se evaluarán las características analíticas de los métodos desarrollados. Esto implicará establecer los intervalos de linealidad, la evaluación de la precisión y el cálculo de los límites de detección y cuantificación para los compuestos estudiados. Además, también serán caracterizadas las superficies mediante métodos electroquímicos y no electroquímicos.

4. Aplicación de los biosensores enzimáticos e inmunosensores desarrollados al análisis de muestras reales.

Tanto los biosensores como los inmunosensores desarrollados se aplicarán a la determinación de analitos de interés en muestras reales o matrices complejas. El efecto de la contribución de posibles interferentes será evaluado para estimar la viabilidad de su empleo en aplicaciones reales. La validez de la metodología empleada se verificará en la medida de lo posible mediante comparación de los resultados obtenidos con los proporcionados por un método de referencia.

BIOSENSORES

4.1 Definición

De acuerdo con la definición de la IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*) [1, 2], un **biosensor** es un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula), o biomimético (PIMs, aptámeros, PNAs), íntimamente asociado a un transductor fisicoquímico (**Figura 4.1**), que en presencia de analito, produce una señal discreta o de carácter continuo (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial, masa, variación de propiedades ópticas, etc.), proporcional a la cantidad de analito presente en la matriz en la que se encuentra.

Las características más importantes de los biosensores y que los convierten en herramientas analíticas competitivas frente a técnicas clásicas de análisis (microdiálisis, electroforesis, cromatografía, ...) son: *especificidad, alta sensibilidad, corto tiempo de análisis, uso en sistemas de Análisis por Inyección de Flujo (FIA), facilidad de automatización, capacidad de trabajo en tiempo real, bajo coste de fabricación, etc.*, [3-5].

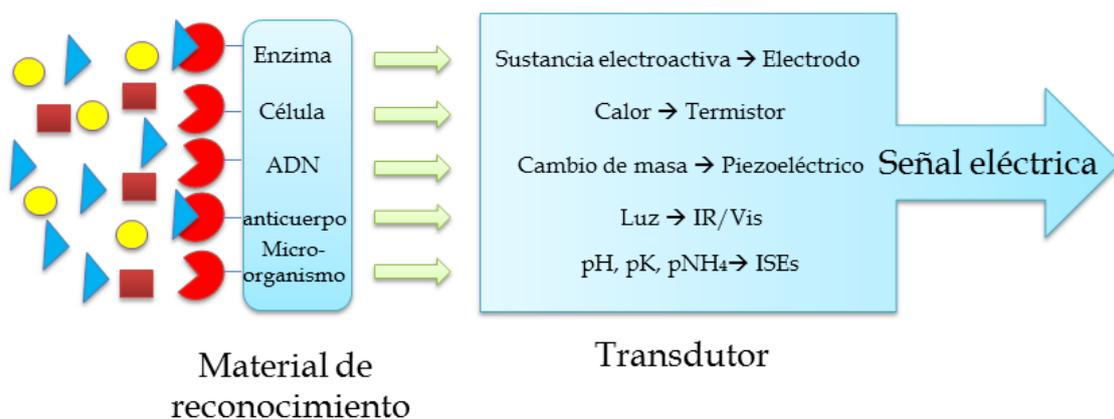


Figura 4.1 Esquema de las partes de un biosensor y acoplamiento entre distintos sistemas de reconocimiento y transducción.

El nacimiento de los biosensores se puede atribuir a *Leland C. Clark Jr.* [6, 7], quien sugirió por primera vez la posibilidad de modificar un electrodo de oxígeno para estudiar una reacción enzimática que consumiera dicho reactivo. En este caso, la enzima (*Glucosa oxidasa, Gox*) fue retenida en la superficie de un electrodo de oxígeno mediante una membrana semipermeable de diálisis. Clark observó que la respuesta de este nuevo dispositivo era proporcional a la concentración de glucosa. Es decir, la enzima oxidaba la glucosa y en consecuencia se producía un descenso proporcional de la concentración de oxígeno en la superficie del electrodo. En las primeras publicaciones Clark y Lyons acuñaron el término “*electrodo enzimático*” a su nuevo invento [7].

Posteriormente, otros autores realizaron implementaciones basadas en este diseño donde se empleaban dos electrodos de oxígeno, uno recubierto con enzima y otro no [8]. Con esta modificación se pudieron corregir las variaciones de oxígeno en el medio (*efecto matriz*). En 1973, Guilbault y Lubrano desarrollaron un electrodo enzimático para determinar glucosa en sangre mediante detección amperométrica (*anódica*) del peróxido de hidrógeno generado durante la reacción enzimática [6, 9]. En 1975, comenzó la comercialización de este dispositivo por la empresa *Yellow Spring Instruments* (analizador YSI modelo 23) [6, 10].

Durante la década de los 80, la comunidad científica mostró mucho interés en los biosensores, llegando a ser *hot-topic*, impulsado sobre todo por el avance en biotecnología y el desarrollo en microelectrónica. Durante esta década los esfuerzos se centraron en el desarrollo de biosensores mediadores de '*segunda generación*' [11, 12], la introducción de tiras comerciales para la auto-monitorización de la glucosa en sangre [13, 14], y el uso de electrodos modificados para mejorar las propiedades analíticas de los dispositivos[15].

Posteriormente, en la década de los 90 comenzaron a desarrollarse los biosensores de ‘*tercera generación*’, donde la transferencia electrónica es producida entre el centro redox de la enzima y la superficie del electrodo, [16, 17] y los dispositivos implantables [16, 18].

En las últimas décadas, el diseño y la aplicación de biosensores en distintos campos de la química analítica han continuado creciendo. Principalmente, el desarrollo de biosensores ha estado centrado en el diagnóstico clínico (biosensores sensibles a glucosa) [3, 4, 6]. Sin embargo, han aparecido muchas aplicaciones en el ámbito medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico y militar [19-29]. En los últimos años, se ha incrementado el número de publicaciones científicas, revisiones y patentes sobre desarrollo de biosensores. Esto refleja el gran interés que despiertan estos dispositivos en la comunidad científica, debido principalmente al empleo de nuevos materiales (*nanopartículas, nanotubos de carbono, grafenos, etc.*) [30-34] y elementos de reconocimiento (*anticuerpos, receptores iónicos, compuesto biomiméticos*) [1, 3, 11, 14, 16-18, 21, 29, 32, 33, 35] que han mejorado las características analíticas de estos dispositivos.

4.2 Clasificación de los biosensores

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios (**Tabla 4.1**). Según el *tipo de interacción* entre analito y material biológico, *método de detección*, naturaleza del *material biológico de reconocimiento* o naturaleza del *sistema de transducción* empleado [1, 4, 6, 29].

Las clasificaciones más utilizadas son: (1) en función del tipo de interacción existente entre el elemento de reconocimiento y el analito: *biocatalítico* (enzimas, células, orgánulos) y *bioanifidad* (anticuerpo, lectinas, receptores biológicos, ácidos nucleicos);

(2) según el sistema de transducción empleado para seguir la reacción de biorreconocimiento.

Tabla 4.1 Criterios de clasificación de biosensores.

| <i>Tipo de interacción</i> | <i>Detección de la interacción</i> |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Biocatalítico | Directo |
| Bioafinidad | Indirecto |
| | |
| <i>Elemento de reconocimiento</i> | <i>Sistema de transducción</i> |
| Enzima | Electroquímicos |
| Orgánulo, tejido | Ópticos |
| Receptor biológico | Piezoeléctricos |
| Anticuerpo | Termométricos |
| Ácidos nucleicos | Nanomecánicos |
| PIM (polímeros de impresión) | |
| Aptámeros | |

4.2.1 Clasificación en función del elemento de reconocimiento

Las moléculas utilizadas como elementos de reconocimiento deben cumplir ciertos requisitos fundamentales para poder ser empleadas como unidades sensoras: (1) poseer afinidad hacia el elemento objeto de reconocimiento; (2) reconocer de manera selectiva al elemento de interés en presencia de otros compuestos (interferentes); y (3) estabilidad frente al tiempo [1, 4, 6, 29]. El reconocimiento molecular puede dar lugar a un enlace entre el elemento receptor y la molécula de interés (*antígeno-anticuerpo*), o bien, a una interacción de naturaleza catalítica (*enzima-sustrato-producto*). Este es el principal criterio utilizado para clasificar los biosensores en *bioafinidad* o *biocatalíticos*.

4.2.1.1 Biosensores biocatalíticos

Se basan en la utilización de catalizadores biológicos participantes en una reacción química [1, 3, 4, 6, 20, 24, 36]. Una vez finalizado el proceso, el biocatalizador puede ser regenerado y utilizado en un nuevo ciclo catalítico.

Estos biocatalizadores pueden ser enzimas aisladas o paquetes multienzimáticos que pueden actuar de manera encadenada en orgánulos celulares, células completas y tejidos animales o vegetales. Las enzimas disponibles comercialmente más utilizadas son las de la familia de las *óxido-reductasas* (*glucosa oxidasa*, *xantina oxidasa*, *lactato oxidasa*, *glutamato oxidasa*, etc.). Son enzimas muy estables que catalizan reacciones de óxido-reducción y pueden acoplarse a distintos sistemas de transducción.

Las principales ventajas de la utilización de enzimas en la construcción de biosensores son: (1) elevada selectividad, (2) rápida respuesta, (3) método de detección simple, (4) capacidad de autoregeneración y (4) extensa disponibilidad comercial [3-5].

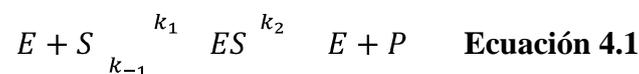
4.2.1.1.1 Biosensores enzimáticos

El biosensor biocatalítico más utilizado es el enzimático debido esencialmente a que las enzimas: (1) son altamente selectivas al analito de interés (sustrato); (2) son capaces de incrementar la velocidad de reacción (catálisis) sin llegar a ser consumidas, es decir, son capaces de regenerarse durante la reacción enzimática (mediante el uso de un cofactor externo). Estas dos propiedades son las que hacen que las enzimas sean los materiales biológicos más ampliamente utilizados en el desarrollo de biosensores.

Con el propósito de mejorar las características de los biosensores enzimáticos es posible desarrollar biosensores enzimáticos empleando dos o más enzimas. De esta forma se puede:

- Aumentar la sensibilidad del método (empleando una enzima auxiliar que regenere el sustrato o analito)
- Obtener un nuevo producto más fácil de detectar (la enzima auxiliar actúa catalíticamente sobre uno de los productos de la reacción enzimática principal)
- Catalizar una reacción sobre especies interferentes (la enzima auxiliar cataliza la reacción de los interferentes para evitar que afecte a la reacción enzimática principal)

Los estudios sistemáticos sobre actividad enzimática comenzaron a finales del siglo XIX. En 1882 se introdujo el concepto *complejo enzima-sustrato* (ES) como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, *Leonor Michaelis y Maud Menten*, desarrollaron esta teoría y plantearon una ecuación de velocidad que explicaba el comportamiento cinético de las enzimas. Para expresar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente sucedían *en dos etapas*: En la primera etapa ocurre la *formación del complejo ES* (etapa rápida) (**Ecuación 4.1**) y en la segunda etapa, el complejo ES, da lugar a la *formación del producto P* (paso lento de la reacción), liberando a la enzima para que pueda realizar un nuevo ciclo catalítico:



En este esquema, k_1 , k_{-1} y k_2 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso y reciben el nombre de *constantes microscópicas de velocidad*.

Por lo tanto, se puede afirmar que:

$$v_1 = k_1 [E] [S] \quad \text{Ecuación 4.2}$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES] \quad \text{Ecuación 4.3}$$

$$v_2 = k_2 [ES] \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde $[E]$, $[S]$ y $[ES]$ son las concentraciones de enzima libre, sustrato y complejo enzima-sustrato, respectivamente. La concentración total de enzima, $[E_T]$, (constante a lo largo de la reacción) es:

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Reordenando:

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad \text{Ecuación 4.6}$$

Sustituyendo 4.6 en 4.2 se puede expresar v_1 como:

$$v_1 = k_1 S E_T - k_1 S ES \quad \text{Ecuación 4.7}$$

Adoptando la *hipótesis del estado estacionario*, según la cual la concentración del complejo ES es pequeña y constante a lo largo de la reacción ($d[ES]/dt = 0$), se obtiene que:

$$\frac{d ES}{dt} = v_1 - v_{-1} - v_2 = k_1 S E_T - k_1 S ES - k_{-1} ES - k_2 ES = 0$$

$$\text{Ecuación 4.8}$$

Reordenando:

$$k_1[S] [E_T] - k_1 [S] [ES] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad \text{Ecuación 4.9}$$

Despejando $[ES]$:

$$[ES] = (k_1[S] [E_T]) / (k_1 [S] + k_{-1} + k_2) \quad \text{Ecuación 4.10}$$

Operando:

$$[ES] = \frac{[S][E_T]}{S + [(k_{-1} + k_2) / k_1]} \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Finalmente:

$$[ES] = \frac{[S][E_T]}{S + K_M} \quad \text{Ecuación 4.12}$$

Donde K_M es la *constante de Michaelis-Menten*:

$$[(k_{-1} + k_2) / k_1] = K_M \quad \text{Ecuación 4.13}$$

Como $[ES]$ es constante, y k_2 es el paso lento de la reacción enzimática, la velocidad de formación de productos es constante, y dependerá únicamente de $[ES]$, luego la velocidad macroscópica del proceso es:

$$v = v_2 = k_2 ES = cte \quad \text{Ecuación 4.14}$$

Por lo tanto, la velocidad de formación del producto en estado estacionario sería:

$$v = k_2 \frac{[E_T] S}{S + K_M} \quad \text{Ecuación 4.15}$$

Para cualquier reacción enzimática, $[E_T]$, k_2 y K_M son constantes. Considerando dos casos extremos:

- 1) *A pequeñas concentraciones de sustrato ($[S] \ll K_M$) $v = (k_2 [E_T]/K_M) [S]$. Los términos entre paréntesis son constantes y pueden englobarse en una nueva constante, k_{obs} , quedando la expresión de la velocidad reducida a: $v = k_{obs} [S]$. La velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato y por lo tanto, se trata de un *proceso cinético de primer orden*.*

2) A elevadas concentraciones de sustrato ($[S] \gg K_M$), $v = k_2 [E_T]$. La velocidad de reacción es independiente de la concentración de sustrato y, por consiguiente, la reacción es un **proceso cinético de orden cero**. Donde k_2 y $[E_T]$ son constantes y es posible definir un nuevo parámetro, la **velocidad máxima de la reacción** (V_{max}), siendo $V_{max} = k_2 [E_T]$. La velocidad máxima de la reacción es la velocidad que se alcanzará cuando toda la enzima disponible se encuentre unida al sustrato (**saturación enzimática**).

Introduciendo el parámetro V_{max} en la ecuación general de la velocidad, se obtiene la expresión más conocida de la **ecuación de Michaelis-Menten**:

$$v = \frac{S}{K_M + S} \cdot V_{max} \quad \text{Ecuación 4.16}$$

La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v frente a $[S]$) es una curva hiperbólica (**Figura 4.2**). V_{max} corresponde al máximo valor al que tiende la curva experimental y K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

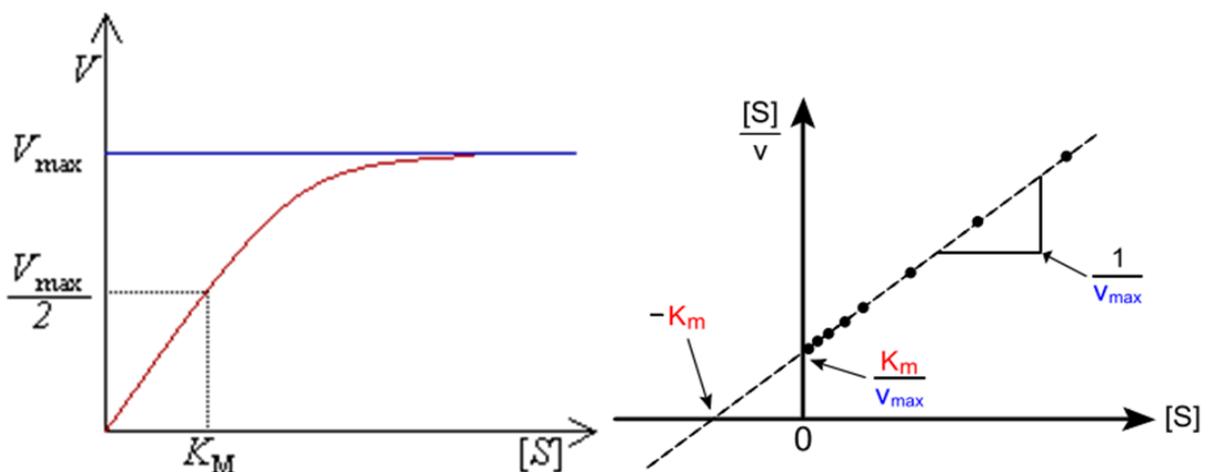


Figura 4.2 a) Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten. b) Linealización de la ecuación de Michaelis-Menten.

K_M representa un parámetro cinético importante por varias razones:

- 1) La razón $V_{max}/K_M \sim$ sensibilidad analítica en el tramo inicial
- 2) El valor de K_M aporta una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato:
 - a menor $K_M \rightarrow$ mayor afinidad
 - a mayor $K_M \rightarrow$ menor afinidad

Este comportamiento se puede explicar fácilmente teniendo en cuenta la **Ecuación 4.1**, donde el complejo ES se forma y disocia en las reacciones [(1)] y [(2) y (-1)] respectivamente. Así, si K_M es grande, $(k_{-1} + k_2) \gg k_1$ (ver **Ecuación 4.13**) predomina la disociación del complejo ES (poca afinidad hacia el sustrato). En el otro extremo, para valores pequeños de K_M , $(k_{-1} + k_2) \ll k_1$ predomina la formación del complejo ES (gran afinidad hacia el sustrato).

4.2.1.2 Biosensores de bioafinidad

Los biosensores de bioafinidad se basan en la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento sin que medie transformación catalítica. La interacción implica la aparición y/o modificación del equilibrio analito-receptor.

La interacción puede ser cuantificada mediante métodos directos del tipo *sándwich*, *desplazamiento* o *competitivos*. En este caso, ni se consumen sustratos ni se generan productos de reacción, por lo tanto, es necesario recurrir al marcaje del receptor implicado, o bien, al de algún elemento que compita con el analito por la unión al receptor. Normalmente, son utilizados como marcadores compuestos fluorescentes, nanopartículas o enzimas que intervengan en una reacción complementaria fácilmente transducible. En la actualidad, son empleados distintos receptores de bioafinidad del

tipo anticuerpos [37-42], lectinas [43-49], ácidos nucleicos [50-54], aptámeros [55-60], etc.

4.2.1.2.1 Inmunosensores

En los biosensores de afinidad, el proceso de reconocimiento biomolecular está controlado por parámetros termodinámicos (forma y tamaño de receptor y ligando), a diferencia de los sistemas biocatalíticos, controlados por parámetros cinéticos. Dentro del grupo de los biosensores de bioafinidad, los inmunosensores, son con diferencia los de mayor empleo y difusión. Se basan en una reacción de reconocimiento molecular entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ab), donde ambos se unen sitios concretos, mediante formación de múltiples enlaces no covalentes (mediante fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, uniones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) formando así, el *complejo antígeno–anticuerpo*.

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina sintetizadas por los linfocitos B. Pueden encontrarse solubles en sangre u otros fluidos corporales de vertebrados. Son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como, bacterias, virus o parásitos.

Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) y dos pesadas (H) iguales entre sí. Las uniones entre cadenas se realizan mediante puentes disulfuro. Las cadenas presentan una región variable (V), característica de cada anticuerpo, situada en los dominios N terminales de cada cadena (V_L y V_H). Los dominios C terminales son secuencias de aminoácidos que constituyen la región constante del anticuerpo (C_H y C_L) (**Figura 4.3**). La región constante (dominios C

terminales) es análoga para inmunoglobulinas de la misma clase pero difiere para las distintas variedades de inmunoglobulinas.

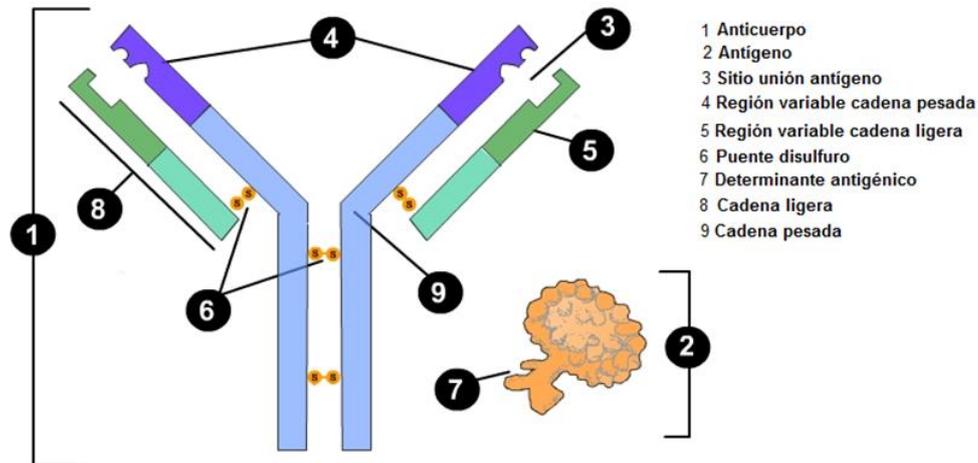
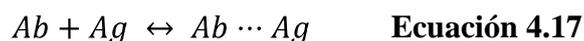


Figura 4.3 Representación esquemática de las distintas regiones de un anticuerpo.

Las zonas de reconocimiento antigénico (3 en **Fig. 4.3**) se denominan *parátomos*. Los parátomos están determinados por la secuencia variable de los extremos amino terminales de cada cadena, siendo los responsables de la especificidad antigénica de un anticuerpo determinado. La porción de antígeno que interviene en una reacción con un anticuerpo (7 en **Fig. 4.3**) se denomina *determinante antigénico* o *epítipo*. Dependiendo del tamaño y complejidad del antígeno incluso pueden estar formados por varios.

La interacción antígeno–anticuerpo es una reacción reversible que viene determinada por la constante de afinidad, K (constante de equilibrio):



$$K = \frac{[Ab \cdots Ag]}{[Ab][Ag]} \quad \text{Ecuación 4.18}$$

Donde, $[Ab \cdots Ag]$ es la concentración del complejo antígeno–anticuerpo (complejo inmunológico), $[Ab]$ y $[Ag]$ son las concentraciones de anticuerpo y antígeno libres, respectivamente, en el equilibrio.

La gran selectividad de los anticuerpos viene dada por la esteroespecificidad en los puntos de unión con el antígeno, lo que da lugar, a constantes de afinidad entre 10^5 - 10^{12} . Por lo tanto, la alta especificidad y selectividad de las uniones antígeno–anticuerpo ofrecen la posibilidad de utilizar estas proteínas en el desarrollo de biosensores altamente específicos para el análisis a tiempo real de matrices complejas, sin necesidad de llevar a cabo extensos pretratamiento o utilización de grandes volúmenes de muestra.

El destacado interés por los anticuerpos debido al gran potencial de aplicación, ha hecho que hoy en día, existan empresas biotecnológicas que generan anticuerpos a la carta para casi todos los analitos, incluido los no inmunogénicos. Sin embargo, la mayoría de inmunosensores desarrollados presentan dos limitaciones:

1. Elevada constante de afinidad de interacción inmunoquímica (la regeneración óptima de las fases sensoras es difícil y en muchos casos imposibles, siendo normalmente sensores de un solo uso). La fragilidad del anticuerpo hace que al emplear métodos habituales para favorecer la disociación se desnaturalice y pierda su actividad
2. Dificultad para cuantificar de manera directa la formación de inmunocomplejo (la interacción antígeno–anticuerpo no produce ni consume reactivos fácilmente detectables, como en el caso de los biosensores catalíticos). Muchos inmunosensores, con estos sistemas de reconocimiento, necesitan el empleo de reactivos marcados para la detección indirecta de la interacción antígeno–

anticuerpo, lo que implica la adición de nuevos reactivos no integrados en la fase sensora, así como, aumento en el tiempo de análisis.

La dificultad para cuantificar de manera directa la formación de inmunocomplejo ha sido solventada desarrollando inmunosensores imitando las técnicas de inmunoanálisis (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA). Actualmente, son utilizados en el desarrollo de inmunosensores anticuerpos marcados con enzimas. Estas enzimas son las que permiten finalmente cuantificar la concentración de analito, debido a la generación de productos fácilmente detectables. Además, su alto poder catalítico es capaz de amplificar la señal, permitiendo alcanzar límites de detección más bajos. Las enzimas utilizadas frecuentemente son del tipo peroxidasas, fosfatasas alcalinas, glucosa oxidasas o catalasas.

Han sido descritas diferentes configuraciones para el desarrollo de inmunosensores enzimáticos, siendo las más habituales las de tipo “sandwich” y las competitivas (Figura 4.4).

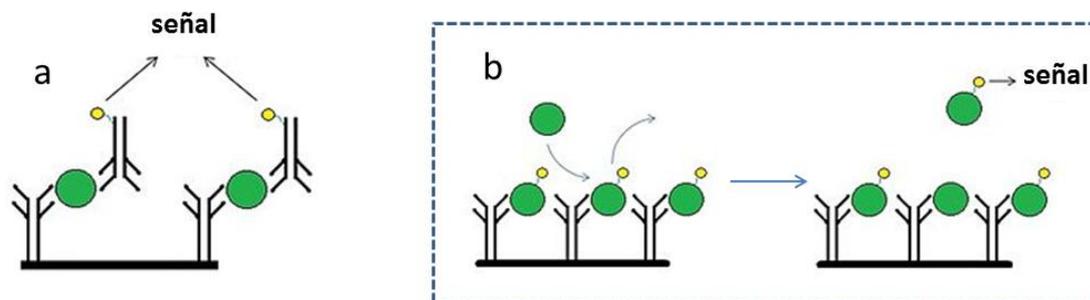


Figura 4.4 (a) inmunoensayos tipo “sándwich”. (b) inmunoensayo competitivo.

En los inmunosensores competitivos, tanto el antígeno de la muestra (Ag) como el antígeno marcado con la enzima (Ag*) compiten por los sitios de unión de un anticuerpo específico (Ab). La concentración del anticuerpo que se encuentra inmovilizado sobre el soporte sólido es limitante. Es decir, cuanto mayor sea la

concentración de Ag en la muestra, menor cantidad de Ag* se unirá al Ab, siendo la medida obtenida inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. De esta manera, la información analítica viene dada por la monitorización de la reacción enzimática.

En los inmunosensores tipo “sandwich”, el antígeno (analito) se une al anticuerpo inmovilizado en el transductor a través de un epítopo y, a su vez, el anticuerpo marcado con enzima se une al antígeno a través de otro epítopo diferente. En esta configuración, cuanto mayor sea la concentración de Ag en la muestra, mayor Ab* se unirá, siendo la medida obtenida directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. En general, el esquema “sandwich” proporciona un límite de detección un orden de magnitud más bajo que el formato competitivo.

La diferencia entre un inmunoensayo tipo “sándwich” y uno competitivo es que en el de tipo “sándwich” existe un “*intercalado*” superposición de anticuerpos, donde el analito sirve de nexo de unión entre ambos y en el inmunoensayo competitivo, el analito marcado es desplazado por el analito no marcado.

4.2.2 Clasificación en función del tipo de transductor

El sistema de transducción o más comúnmente conocido como *transductor*, es el elemento y generalmente soporte del material biológico. Es capaz de transformar variaciones de las propiedades físico-químicas producidas por interacciones específicas analito-sistema de reconocimiento, en una señal que puede ser registrada, amplificada y almacenada. Dicha señal, proporciona información cuantitativa o semicuantitativa de un analito determinado. Para un funcionamiento adecuado del biosensor, el elemento de reconocimiento y el sistema de transducción deben estar en contacto directo. En función de la naturaleza del sistema de transducción podemos diferenciar varios tipos:

4.2.2.1 Electroquímicos

Los transductores electroquímicos transforman la señal producida por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito, en una señal eléctrica [4, 6, 12, 20]. Dicha señal proporciona información analítica cuantitativa del analito que la origina (ver *sección 4.3*).

4.2.2.2 Másicos, piezoeléctrico o acústicos

Los sistemas de transducción piezoeléctricos, miden cambios de masa inducidos por la formación de complejos receptor-analito sobre la superficie del electrodo (cristal). La frecuencia de oscilación de un cristal viene determinada por su masa, por lo tanto, de acuerdo con la ecuación de Sauerbrey (**Ecuación 4.19**), la variación de la frecuencia (ΔF) cuando se produce una interacción, se podrá relacionar con la concentración de analito [61-65].

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A \rho_a \mu_a} \Delta m \quad \text{Ecuación 4.19}$$

Donde F_0 es la frecuencia de resonancia del modo fundamental microbalanza de cuarzo, A es el área efectiva del electrodo, ρ_a es la densidad del cuarzo, μ_a es el módulo de corte del cuarzo, Δm es el cambio de masa.

4.2.2.3 Térmicos

Los transductores termométricos (generalmente termistores) son capaces de medir cambios de calor originados por reacciones enzimáticas. En este caso, la variación de temperatura se puede relacionar con la concentración de analito [66, 67].

4.2.2.4 Ópticos

Los transductores ópticos miden variaciones en las propiedades de la luz (absorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción) producidas como consecuencia de la interacción física o química entre analito y biosensor [68-72]. A principios de los 90 apareció una nueva tecnología basada en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR) que ha permitido el estudio en tiempo real del proceso de interacción entre biomoléculas. La SPR se produce por la reflexión total del haz de luz incidente al interactuar con los plasmones, observándose una reducción de la intensidad de luz (**Figura 4.5**).

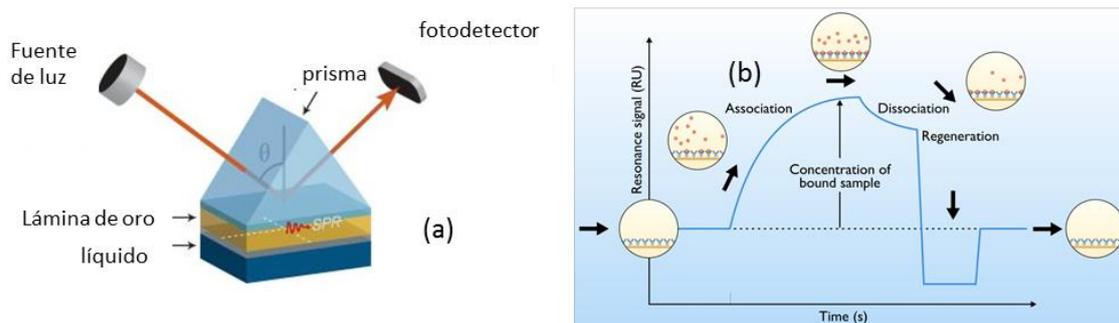


Figura 4.5 (a) Esquema de medida de un dispositivo SPR. (b) Seguimiento de un inmunoensayo mediante SPR.

4.3 Biosensores electroquímicos

Los *transductores electroquímicos* transforman la señal producida por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica [3-6, 10, 20, 33]. Las técnicas electroanalíticas son capaces de proporcionar límites de detección excepcionalmente bajos, además de cuantiosa información sobre los sistemas estudiados: estequiometría, velocidad de transferencia de carga, velocidad de transferencia de masa, constante de velocidad y constante de equilibrio.

El uso de transductores electroquímicos en el desarrollo de biosensores presenta numerosas ventajas: (1) necesidad de pequeños volúmenes, incluso del orden de nanolitros; (2) obtención de señal eléctrica, (3) límites de detección adecuados para detección de numerosos analitos interesantes, incluso a nivel biológico; (4) susceptibles a la miniturización; (5) relativa simplicidad de funcionamiento; (6) bajo coste de instrumentación analítica; (7) dispositivos especialmente apropiados para monitorización en tiempo real.

Dependiendo del proceso de transducción existen tres tipos de biosensores electroquímicos: *potenciométricos*, *conductimétricos*, y *amperométricos* [1, 4, 6, 20].

4.3.1 Biosensores Potenciométricos

Se basan en la medida de la diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos (*indicador* y *referencia*) en ausencia de corriente. Las variaciones en la medida del potencial de celda vienen determinadas por la ecuación de Nernst (**Ecuación. 4.20**) siendo proporcional a la concentración de algún ion generado durante la reacción enzimática.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad \text{Ecuación 4.20}$$

Donde E es el potencial aplicado, E^0 es el potencial estándar, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en grados Kelvin, F es la constante de Faraday, C_O es la concentración de la especie oxidada, C_R es la concentración de la especie reducida. Un ejemplo de este tipo de biosensor lo tenemos en el sensor selectivo a NH_4^+ modificado con ureasa. Durante la reacción, la enzima descompone la urea (**Ecuación. 4.21**) en iones amonio y carbonato [3], los cuales pueden ser determinados por este tipo de sensores.

4.3.2 Biosensor Conductimétricos

Este tipo de transductores mide cambios de conductividad, en la disolución de medida o en membranas selectivas dispuestas en la superficie de electrodos conductimétricos, generados por la interacción con el analito [1, 6]. El ejemplo más característico lo constituye el biosensor de urea. La generación de iones carbonato y amonio (**Ecuación 4.21**) produce un aumento en la conductividad del medio registrable con este tipo de biosensor [3].



4.3.3 Biosensores Amperométricos

Se basan en la medida de corriente eléctrica generada por el intercambio electrónico entre el material de biorreconocimiento y el transductor [5, 6, 10, 16, 60]. La posibilidad de poder incorporar al transductor nuevos componentes, tipo mediadores redox, cofactores y otras biomoléculas, confiere a este tipo de biosensores una gran versatilidad de uso.

4.3.3.1 Clasificación de biosensores amperométricos

Durante las reacciones de oxidación-reducción los electrones son transferidos entre reactivos y productos. Desde el punto de vista enzimático, el resultado final es la transferencia de uno o varios electrones de la enzima a la superficie del transductor. Teniendo en cuenta el proceso de transferencia electrónica se pueden distinguir tres tipos o generaciones de biosensores:

4.3.3.1.1 Biosensores de 1ª generación

En este tipo de biosensores, la reacción enzimática (**Ecuación 4.22**) es seguida mediante la formación de un producto electroactivo (**Ecuación 4.23**) o mediante el consumo de un cosustrato (**Ecuación 4.24**) empleado por la enzima para volver a su estado inicial [6]. Los biosensores de 1ª generación fueron los primeros en desarrollarse. El electrodo modificado con *Gox* de Clark, pertenece a este grupo [7]. El inconveniente de medir algunos cosustratos o productos de reacción radica en la necesidad de aplicar potenciales muy elevados (sobrepotenciales). Estos sobrepotenciales pueden producir tanto fenómenos de interferencias como polimerizaciones de productos de reacción en la superficie que alteren las condiciones cinéticas y el funcionamiento del biosensor.



Para intentar evitar estos inconvenientes es necesario: (1) el empleo de membranas permeoselectivas que impidan la llegada de interferentes a la superficie activa del transductor, (2) la detección catalítica de los intermedios de reacción (H_2O_2) y (3) uso de mediadores redox artificiales que reduzcan el potencial aplicado. El uso de este tipo de mediadores dio lugar a la segunda generación de biosensores amperométricos.

4.3.3.1.2 Biosensores de 2ª generación

Los biosensores de segunda generación utilizan un mediador encargado de transferir los electrones puestos en juego en el centro activo enzimático hacia la superficie del transductor [4, 6, 20]. De esta manera, se sustituye el cosustrato natural empleado por la enzima. El mediador debe tener ciertas características para favorecer el proceso: (1) transferir los electrones rápidamente para evitar la competencia de los cosustratos

naturales de la enzima; (2) tener un potencial redox próximo a cero, para evitar la interacción con otros analitos que puedan actuar como interferentes.

Los mediadores más utilizados, tanto libres como inmovilizados en un hidrogel, son el par ferro/ferricianuro, ferroceno y sus derivados, 1,4-benzoquinonas, azul de metileno, rojo neutro y algunos complejos de osmio y rutenio [20].

Los principales problemas que presentan estos biosensores son debidos a la competencia de los cosustratos naturales y a la pérdida de estequiometría de la reacción, así como, la pérdida del mediador (*potencialmente tóxico*) por difusión y contaminación de la muestra.

4.3.3.1.3 Biosensores de 3ª generación

En este caso, la enzima es ensamblada directamente en la superficie del transductor [73-79], evitando así, el uso de cualquier intermedio de reacción (cosustrato o mediador redox). Este tipo de biosensores presenta mayor selectividad, ya que los potenciales utilizados son más próximos a los intrínsecos de la enzima. Según la *teoría de Marcus*, la espontaneidad del proceso de transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo va a depender de lo accesible que sea el centro activo de la enzima [80].

Una de las enzimas más factibles para ser utilizada en este tipo de biosensores es la HRP (peroxidasa de rábano), debido a la localización de su centro activo, ya que no se halla en el interior de la enzima. Sin embargo, la mayoría de enzimas son sistemas muchos más complejos y presentan sus centro activos mucho más protegidos. Ejemplos evidentes de esta aproximación son los biosensores que incluyen en su estructura sales orgánicas conductoras tales como: tetratiofulvaleno (TTF) y/o tetracianoquinodimetano (TCNQ).

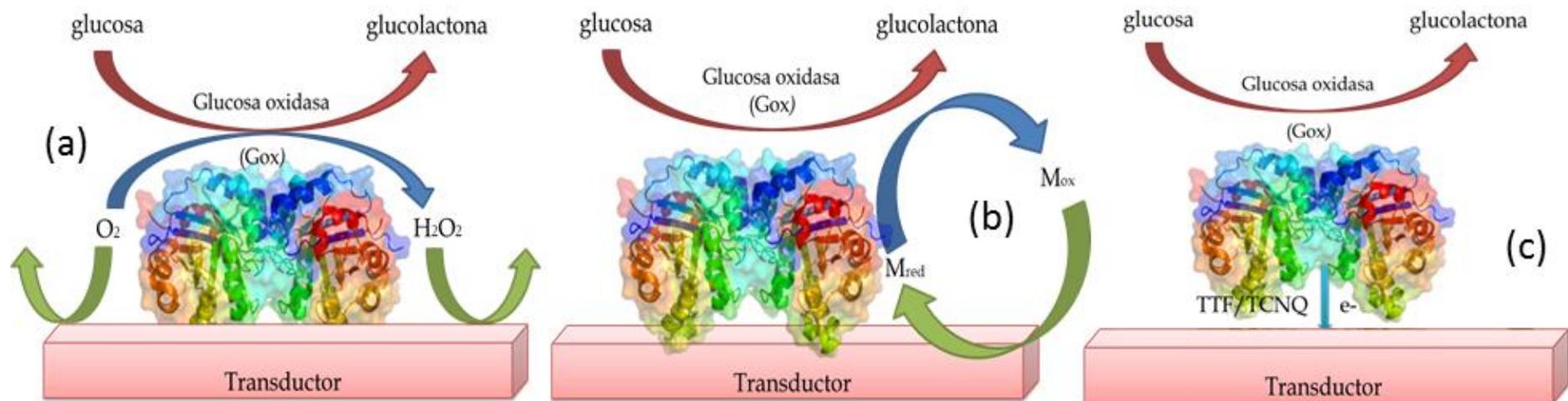


Figura 4.4 Esquema de las reacciones que ocurren en un biosensor de: (a) 1^a generación, basado en la detección amperométrica de H₂O₂ o de O₂; (b) un biosensor de 2^a generación; (c) un biosensor de 3^a generación.

NANOTECNOLOGÍA

5.1 Nanotecnología

La nanotecnología es un área interdisciplinar dedicada al estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales nanoestructurados para su explotación tanto a nivel laboratorio como a escala industrial. Los materiales con microestructuras controladas a escalas cuasi-atómica han dado lugar a un nuevo campo de investigación multidisciplinar donde concurren la física del estado sólido, la química, la ciencia de los materiales, etc. Podemos definir como materiales nanoestructurados a aquellos cuyos “constituyentes” tienen dimensiones menores de 100 nm en al menos una de sus dimensiones. Los materiales de tamaño nanométrico poseen propiedades físicas y químicas diferentes a las del material masivo “*bulk*”. Un ejemplo claro lo constituyen las partículas magnéticas empleadas en la presente tesis, donde la reducción de tamaño trae consigo un cambio de comportamiento magnético, pasando de ser ferro o ferrimagnético a superparamagnético. Actualmente, las nanoestructuras magnéticas muestran una gran variedad de aplicaciones en campos tan diversos como la electrónica, la óptica, remediación y extracción de contaminantes [81-84], tecnología alimentaria [85], desarrollo de dispositivos de análisis (sensores y biosensores), hasta incluso alcanzar áreas tan complejas como la biomedicina [86, 87], donde son utilizadas en el diagnóstico [88-91], transporte y liberación farmacológica [92, 93], hipertermia [94], tratamiento de tumores [95-97], etc.

Una de las principales ventajas que presentan los nanomateriales es el incremento en la relación superficie/volumen al reducir la escala. Este incremento hace que se aumente el número de átomos en superficie en relación al número de átomos en volumen lo que propicia la aparición de efectos mecano-cuánticos influenciados por el tamaño de las nanopartículas. Esta ventaja es muy importante ya que el incremento de la superficie

específica está directamente relacionado con la mejora de la sensibilidad y obtención de límites de detección más bajos.

Las excelentes propiedades electro-catalíticas presentes en algunos de estos compuestos han contribuido a que en la última década, existan numerosas publicaciones relacionadas con la aplicación de nanomateriales en el diseño y desarrollo de dispositivos sensores [98-102], biosensores [103-105], inmunosensores [106-109] y aptasensores [110-112] utilizando la nanotecnología como un valor añadido.

Finalmente, se prevé que en las próximas décadas los avances obtenidos en nanociencia tengan un fuerte impacto en todas las áreas de la ciencia, tecnología, innovación y campo empresarial.

5.2 Nanopartículas

Los materiales nanoestructurados se pueden clasificar en relación a cuántas de las dimensiones de la nanoestructura o la de alguno de sus constituyentes supera el rango de la nanoescala (100 nm). Por lo tanto, se establecen así cuatro categorías: 0D (fullerenos, nanopartículas o clústeres), 1D (nanofibras, nanohilos, nanotubos), 2D (grafeno y películas delgadas) y 3D.

Según la definición dada para nanomaterial no se deberían de incluir los materiales llamados 3D en la categoría de nanoestructuras, ya que todas sus dimensiones superan los 100 nm. Sin embargo, son considerados materiales nanoestructurados 3D aquellos en los que son utilizados para su construcción nanoestructuras (0D, 1D o 2D) como bloques replicados en las 3 direcciones del espacio de forma ordenada.

De manera adicional a la clasificación anterior, las partículas también suelen dividirse en función de su tamaño (diámetro) en partículas: finas (100-2500 nm) y ultrafinas o nanopartículas (1-100 nm).

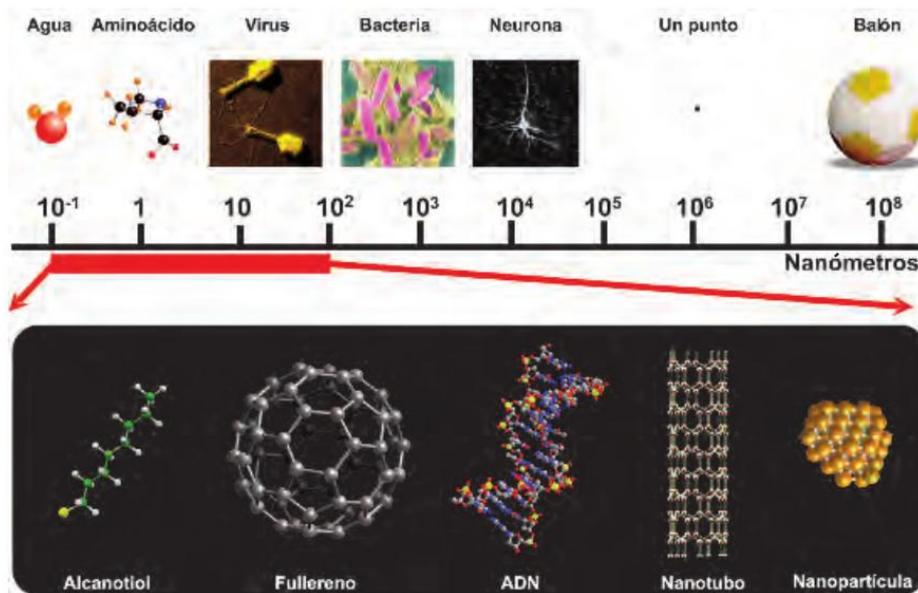


Figura 5.1 Distribución de tamaños en la escala nanométrica.

5.3 Nanopartículas magnéticas (NPMs)

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) resultan especialmente interesantes en ámbitos tan diversos como el biomédico, analítico, ciencia de los materiales, etc., debido a que pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo y empleadas en procesos de separación y concentración [113].

El magnetismo de manera sencilla se puede entender como un fenómeno físico por el cual los objetos ejercen fuerzas de atracción o repulsión sobre otros materiales, debidas a la alineación de los momentos magnéticos internos del material con un campo magnético externo aplicado.

Existen materiales con propiedades magnéticas fácilmente detectables como el níquel, hierro, cobalto y sus aleaciones, comúnmente llamadas imanes. Sin embargo, todos los

materiales son influenciados en mayor o menor medida por la presencia de un campo magnético.

Las propiedades magnéticas de un material son generadas por los movimientos de las partículas (con masa y carga eléctrica propia) que lo constituyen. Consecuentemente, el momento magnético de un átomo libre es debido a dos contribuciones:

- momento angular orbital de los electrones alrededor del núcleo
- momento de espín de los electrones, debido a los electrones desapareados

Por lo tanto, el comportamiento magnético de un material dependerá básicamente del número de electrones desapareados que posea cada átomo, así como, del orbital en el que se encuentren. Una partícula cargada eléctricamente crea, cuando gira, un dipolo magnético llamado magnetrón. Al aplicar un campo magnético externo al material, los dipolos magnéticos se ordenan con el campo aplicado, dando lugar a un momento magnético dentro del material. Los momentos angulares de un electrón (momento orbital y momento de espín) pueden interactuar entre sí, (como cualquier par de dipolos) y producir un acoplamiento espín-orbital. Dependiendo de las características del acoplamiento espín-orbital surgirán las propiedades magnéticas de átomos y moléculas.

En la naturaleza, los materiales presentan dos tipos de comportamientos: (1) paramagnético (presenta momento magnético permanente) y (2) diamagnético (no presenta momento magnético permanente).

A su vez, si los momentos magnéticos permanentes interactúan colectivamente para producir un orden magnético de largo alcance puede aparecer una magnetización espontánea, generando los materiales conocidos como *ferro* o *ferrimagnéticos*, según el

tipo de ordenamiento. En el caso de los materiales *antiferromagnéticos* existe orden de largo alcance pero la magnetización espontánea es nula.

5.3.1 Diamagnetismo

Los materiales diamagnéticos presentan la propiedad de repeler los campos magnéticos, por el contrario los materiales ferromagnéticos son atraídos por ellos [114, 115].

El fundamento de este comportamiento diamagnético se debe a que los átomos o iones que poseen electrones apareados no presentan un momento magnético permanente. *Pero ante un campo magnético aplicado, estos electrones (apareados) precisan originando un campo magnético opuesto al campo magnético aplicado.*

En su gran mayoría, las sustancias son diamagnéticas debido a que los pares de electrones con espín opuesto contribuyen débilmente al diamagnetismo. Sólo en los casos en los que hay electrones desapareados existe una contribución paramagnética en sentido contrario. Como se ha comentado el diamagnetismo es una contribución muy débil, por consiguiente, cualquier otro tipo de comportamiento magnético que presente el material, generalmente superará a los efectos de las corrientes generada por el movimiento de los electrones. En términos de configuración electrónica, el diamagnetismo se observa en aquellos materiales que tienen completas sus subcapas electrónicas, es decir, que los momentos magnéticos están apareados y se contrarresten unos con otros. Los materiales diamagnéticos tienen una susceptibilidad magnética negativa ($\chi < 0$). La *susceptibilidad magnética* es una constante de proporcionalidad adimensional que indica el grado de magnetización en respuesta a un campo magnético aplicado. De esta forma se puede expresar como [116]:

$$\chi = M/H \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde M es la magnetización del material (momento dipolar magnético por unidad de volumen) y H es la fuerza del campo magnético.

5.3.2 Paramagnetismo

Este comportamiento magnético se observa en materiales que tienen electrones desapareados en sus capas atómicas, generalmente en las capas 3d y 4f. Los materiales cuyos momentos magnéticos atómicos no están apareados generan un *momento magnético permanente distinto de cero* y muestran paramagnetismo [115, 117].

Las principales propiedades que definen el paramagnetismo son:

- susceptibilidad magnética ligeramente positiva, $\chi > 0$ y $\chi \sim 0$.
- susceptibilidad magnética proporcional al campo magnético aplicado, $\chi = \chi(H)$.
- magnetización nula en ausencia de campo magnético $H=0 \rightarrow \chi=0$.

En ausencia de campo magnético, la agitación térmica (*contribución entrópica*) fuerza a los espines a disponerse en una orientación aleatoria, perdiéndose así, el magnetismo adquirido. Por debajo de la temperatura de Curie (T_c)¹, no se observa paramagnetismo debido al comportamiento cooperativo que muestran los espines. Finalmente podemos distinguir distintos comportamientos en función de cómo ocurre el solapamiento colectivo de los momentos magnéticos locales: *ferromagnetismo*, *antiferromagnetismo* y *ferrimagnetismo*.

5.3.3 Orden magnético colectivo: Interacción de intercambio y superintercambio

Según el principio de exclusión de Pauli, dos electrones en el mismo orbital deberán tener espines opuestos. Por otro lado, la regla de la multiplicidad de espín de Hund,

¹ Se denomina temperatura de Curie a la temperatura por encima de la cual un cuerpo ferromagnético pierde su magnetismo, comportándose como un material puramente paramagnético.

establece que los orbitales atómicos se ocupan de tal forma que se maximiza el espín total. Como consecuencia, los orbitales solapados influyen en la orientación de los momentos magnéticos vecinos, llevando a un orden de largo alcance [118]. Este fenómeno es consecuencia de la interacción de *intercambio* electrónico y puede producir magnetizaciones macroscópicas elevadas.

En el caso de los óxidos de hierro, el intercambio entre cationes vecinos tiene lugar por medio de la interacción de un electrón orbital de un ión de oxígeno intermedio. A este tipo de interacción se le conoce como *superintercambio*.

Las interacciones de intercambio y superintercambio pueden dar lugar a un ordenamiento magnético espontáneo por debajo de una temperatura crítica. Por debajo de dicha temperatura (T_c) el promedio en el tiempo de las fluctuaciones del espín atómicos es distinto de cero. El comportamiento de los materiales magnéticamente ordenados se puede clasificar de acuerdo con la magnitud de la magnetización de la subred y del carácter positivo o negativo de la interacción de intercambio.

En el *ferromagnetismo*, el intercambio es positivo, resultando una magnetización permanente muy grande [119-121]. En los materiales *antiferromagnéticos*, el intercambio es negativo, y los momentos de las subredes son iguales y opuestos, dando lugar, a una magnetización resultante nula [120, 121]. Si el acoplamiento ión-oxígeno no es de 180° , los momentos de las subredes no se cancelan totalmente y aparece un ferromagnetismo débil sobre un eje perpendicular al eje promedio de los espines (*antiferromagnetismo inclinado*).

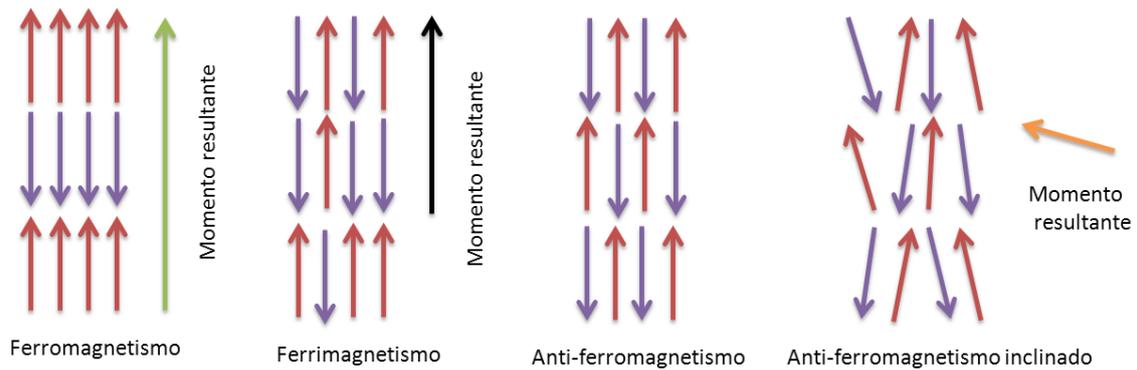


Figura 5.2 Diagrama de magnetización espontánea.

Por otro lado, en el *ferrimagnetismo* el intercambio también es negativo pero en este caso los momentos magnéticos de las subredes antiparalelas no son iguales. De este modo, se genera una magnetización espontánea grande a lo largo del eje de espín.

Como comentamos anteriormente, el orden de largo alcance se pierde por encima de la temperatura crítica T_c (temperatura de Curie), para los materiales ferri y ferromagnéticos, y por encima de la temperatura de Néel (T_n)² para los materiales antiferromagnéticos.

5.3.3.1 Superparamagnetismo

Si todos los momentos magnéticos locales se orientan en la misma dirección se genera una gran cantidad de energía magnetostática, dando lugar, a un dominio magnético [122]. Por lo tanto, un dominio magnético es un volumen de material ferromagnético en el que todos los magnetrones se alinean en la misma dirección (*magnetización uniforme*). Dentro de cada dominio los espines están orientados en la misma dirección, pero ésta dirección es diferente a la de otros dominios magnéticos adyacentes (**Figura 5.3**). Cada región de magnetización uniforme está separada por una barrera. La existencia de barreras es consecuencia del equilibrio entre la energía magnetostática,

² La temperatura de Néel es la temperatura por encima de la cual desaparece el efecto antiferromagnético en los materiales, pasando éstos a comportarse como materiales paramagnéticos. La temperatura de Néel es análoga a la temperatura de Curie de los materiales ferromagnéticos

que aumenta proporcionalmente con el volumen del material, y la energía superficial de la barrera del dominio, que aumenta proporcionalmente con el área interfacial. Aunque aparezca una nueva componente energética debida a la energía interfacial entre los dominios adyacentes, esta configuración multidominio es la más favorable desde el punto de vista energético. Sin embargo, cuando el tamaño de la partícula disminuye el número de dominios magnéticos decrece hasta un valor crítico (D_{crit}) donde el elevado valor de la energía asociada a la barrera de los dominios es termodinámicamente desfavorable y el material se convierte en monodominio. Este tamaño se alcanza cuando se igualan la energía magnetostática con la superficial. Así, el D_{crit} indica el tamaño de transición monodominio-multidominio. Por debajo de dicho valor, el material posee todos sus momentos magnéticos orientados en una misma dirección cuando es aplicado un campo magnético externo. Esto da lugar, a un dipolo permanente dentro del material de magnitud similar a la de los materiales ferromagnéticos y aproximadamente 100 veces superior a la de los materiales paramagnéticos [122]. En el caso de las NPMs, la bibliografía reporta valores de D_{crit} de 128 y 166 nm para la magnetita y la maghemita respectivamente [123].

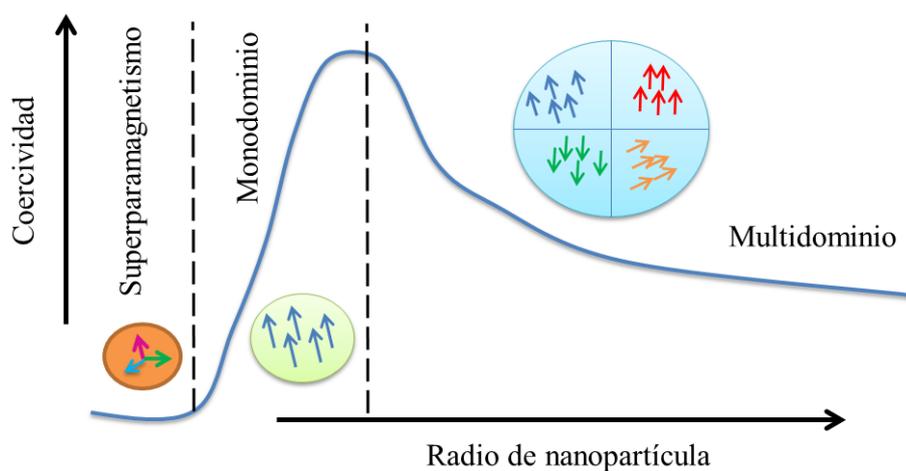


Figure 5.3 Esquema de la relación entre el tamaño y la coercividad.

La respuesta de los materiales ferromagnéticos frente a un campo externo aplicado viene definida por la existencia de un ciclo de histéresis (**Figure 5.4**), caracterizado por dos parámetros principales: la remanencia y la coercividad, relacionados a su vez, con la anchura del ciclo de histéresis.

- (1) La *remanencia magnética* o magnetización remanente es la capacidad de un material para retener el magnetismo que le ha sido inducido, es decir, la magnetización que persiste después de que se retira el campo magnético externo.
- (2) La *coercividad* es la intensidad de campo magnético que se debe aplicar a un material para reducir su magnetización a cero después de que la muestra haya sido magnetizada hasta su saturación (magnetización de saturación, M_s). Por lo tanto, la coercividad mide la resistencia de un material ferromagnético a ser desmagnetizado. Este parámetro es uno de los más importantes a tener en cuenta cuando se trabaja con nanopartículas. Se ha observado que cuando se reduce el tamaño de partícula, inicialmente aumenta la coercividad y posteriormente tiende a cero (**Figura 5.3**).

Cuando el tamaño de las nanopartículas de monodominio continúa disminuyendo se llega a un segundo valor crítico (D_{sp}). El D_{sp} indica la transición de material ferro a *superparamagnético* [124, 125]. Por debajo del valor de D_{sp} , en ausencia de campo externo, los dipolos se orientan al azar debido a que la energía térmica es superior a la energía de anisotropía magnética por partícula.

La energía de anisotropía es responsable de mantener los momento magnéticos de una partícula en una determinada dirección [126]. En consecuencia, el momento magnético resultante es nulo, al igual que ocurre en los materiales paramagnéticos. Este comportamiento es propio de los materiales superparamagnéticos donde la coercividad

llega a cero (**Figura 5.4**, color azul). En las partículas superparamagnéticas dichas contribuciones son lo suficientemente fuertes para desmagnetizar espontáneamente un material previamente saturado. Por consiguiente, estas partículas tienen coercividad cero y no presentan histéresis. De esta manera, las nanopartículas superparamagnéticas se convierten en magnéticas en presencia de un imán externo y vuelven al estado no magnético cuando deja de actuar el campo magnético externo.

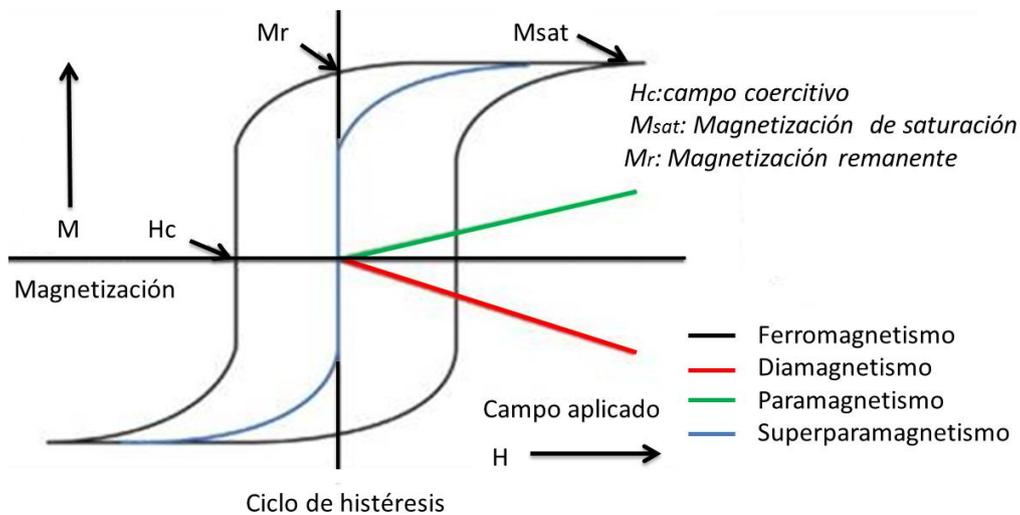


Figura 5.4 Curva de histéresis (Magnetización M frente al campo magnético aplicado H) característica de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas. También se muestra el comportamiento diamagnético (en rojo) y paramagnético (en verde).

5.4 Óxidos de hierro: Magnetita/Maghemita

La *magnetita* (Fe_3O_4) pertenece al grupo de la espinela [127, 128], y posee una estructura cristalina cúbica espinela inversa. En esta estructura los átomos de oxígeno (O^{2-}) presentan un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras (fcc) en la dirección [111], un tercio del hierro como Fe^{3+} ocupa todos los sitios tetraédricos (sitios T), otro tercio de hierro como Fe^{3+} ocupa la mitad de los sitios octaédricos (sitios O) y el último tercio de hierro como Fe^{2+} ocupa el resto de sitios octaédricos (O) [129].

La *maghemita* ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) presenta una estructura espinela no estequiométrica formada estructuralmente solamente por iones Fe^{3+} . Esto hace que la celda de la maghemita sea ligeramente menor que la de la magnetita ya que los iones Fe^{2+} son de mayor tamaño que los iones Fe^{3+} [128, 129]. En la estructura cristalina de la maghemita, la mitad de los iones Fe^{3+} ocupan sitios T mientras que la otra mitad ocupan sitios O [129]. Ambos óxidos de hierro son ferrimagnéticos aunque la magnetización de saturación de la maghemita es ligeramente inferior a la de la magnetita.

5.5 Síntesis de nanopartículas magnéticas

Para poder desarrollar nanosistemas, nanopartículas y nanodispositivos es necesario comprender y controlar las condiciones de síntesis de las nanopartículas que lo componen. Por lo tanto, se han empleado muchos esfuerzos en desarrollar métodos de síntesis que permitan controlar el tamaño, forma y distribución de las nanoestructuras [130].

El material más ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas son las nanopartículas de magnetita, ya que presentan una magnetización de saturación lo suficientemente grande como para permitir su manipulación con la aplicación de un campo magnético externo. Estas nanopartículas, muestran comportamiento superparamagnético y pueden funcionalizarse fácilmente uniendo diferentes moléculas en su superficie. Las nanopartículas de magnetita también presentan características muy atractivas desde el punto de vista biológico. Su uso es muy interesante en aplicaciones biomédicas, debido a que cuando interactúan con moléculas biológicas presentan una gran estabilidad química, baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Las nanopartículas pueden ser preparadas mediante métodos Físicos y Químicos. Actualmente, existen en la bibliografía una gran variedad de métodos de síntesis y

modificaciones (*para más detalle de los métodos de síntesis ver referencias: [130-135]*).

Los métodos físicos consisten principalmente en la subdivisión del precursor masivo hasta alcanzar el tamaño nanométrico deseado (*top-down*). Por el contrario, los métodos químicos se basan en el crecimiento de partículas a partir de los átomos que las constituyen (*bottom-up*). Los métodos físicos incluyen la molienda mecánica (mecanosíntesis), pulverizado y evaporación por descarga de arco de metales, obteniéndose generalmente nanopartículas grandes con una amplia distribución de tamaños donde la superficie del material normalmente presenta defectos importantes y daños cristalográficos. Los materiales obtenidos por estos métodos se suelen usar frecuentemente en la preparación de nanomateriales cerámicos a granel, donde los defectos pueden ser recocidos durante la sinterización y el tamaño y forma de las partículas no son esenciales para su aplicación.

Por el contrario, las nanopartículas sintetizadas químicamente son más pequeñas, presentan composición química más homogénea, menor distribución de tamaño y disminución de los defectos cristalográficos en superficie. El método químico utilizado para la obtención de las nanopartículas dependerá de la aplicación final que se le vaya a dar, así como, del grado de homogeneidad necesario y coste de producción. Los métodos químicos más utilizados son: co-precipitación, micelas inversas, micro-emulsión, síntesis sol-gel, reacciones hidrotérmicas, hidrólisis y termólisis de precursores, síntesis de inyección de flujo y electrospray.

5.5.1 Mecanismo de formación de nanopartículas magnéticas en fase líquida

La formación de nanopartículas en disolución está basada en un modelo apoyado en la teoría clásica de nucleación. Ésta teoría fue publicada por LaMer y Dinegar en 1950 para explicar la formación de sulfuros de naturaleza coloidal [136]. El diagrama de LaMer ilustra la variación de concentración de soluto en función del tiempo (**Figura 5.5**). Los autores identificaron dos procesos claramente diferenciados durante la formación de nanopartículas: *nucleación* y *crecimiento*. Por razones prácticas el diagrama de LaMer se va a dividir en tres etapas (**Figura 5.5**).

En la primera etapa, la concentración de sales empieza a aumentar. Una vez alcanzada la concentración mínima (C_{MIN} , **Figura 5.5**), el sistema se vuelve heterogéneo y las moléculas de soluto se combinan para producir *embriones* o *núcleos*. Estos embriones son el resultado de la colisión de iones o moléculas en disolución mediante el proceso de auto-nucleación. En esta etapa, los núcleos se forman y disuelven constantemente. Su estabilidad dependerá de la altura de la barrera de energía libre (ΔG):

- si la barrera de energía libre es alta en comparación con la energía térmica (kT) la probabilidad de formación de núcleos es despreciable
- si la barrera de energía libre es lo suficientemente baja la tasa de nucleación tiende a ser infinita

En la segunda etapa, la sobresaturación es reducida parcialmente, por la aparición de núcleos, lo suficientemente rápido como para que la tasa de nucleación caiga casi inmediatamente a cero. En esta etapa, la nucleación continuará mientras se permanezca entre el valor crítico de concentración que limita la sobresaturación (C_{MAX} , **Figura 5.5**) y la C_{MIN} , donde el crecimiento de partículas sustituye a la nucleación de partículas. En consecuencia, se puede generar una disolución coloidal de semillas monodispersas

mediante el control de las concentraciones iniciales de precursores, provocando que el periodo en el cual ocurre la nucleación sea corto. Cuantos más núcleos se obtengan, menor será el tamaño, ya que una cantidad dada de masa se distribuye entre un mayor número de centros.

En la tercera etapa, si la concentración disminuye pero el sistema todavía se encuentra sobresaturado se produce el crecimiento de núcleos, dando lugar, a nanopartículas de mayor tamaño. Por lo tanto, el tamaño final de partícula y la tasa de crecimiento dependerán de tres variables: (1) número de núcleos presentes, (2) cantidad total de precursores y (3) coeficiente de difusión. Este coeficiente depende inversamente de la viscosidad y directamente de la temperatura.

El mecanismo de LaMer es estrictamente cierto sólo para el sistema para el que fue desarrollado (sales de azufre). Sin embargo, independientemente de la rigurosa validez de la predicción de LaMer este diagrama proporciona una idea general del mecanismo químico de la formación de NPMs en fase líquida.

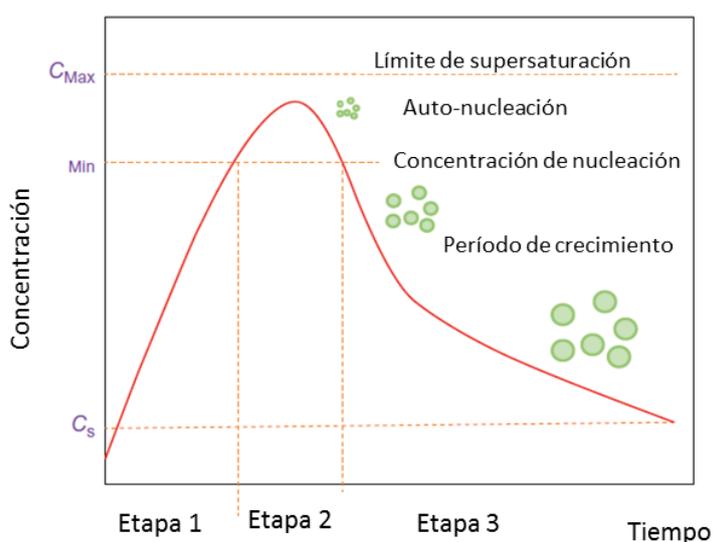


Figura 5.5 Diagrama de LaMer y Dinegar para explicar la formación de sulfuros de naturaleza coloidal.

5.5.2 Métodos Químicos de Síntesis

5.5.2.1 Co-precipitación

Este método es probablemente el más sencillo, eficiente y de fácil escalado a nivel industrial [131]. La magnetita (Fe_3O_4) se obtiene a partir de una mezcla estequiométrica de sales ferrosas y férricas en medio acuoso alcalino y bajo atmósfera inerte. Finalmente, una vez realizado el proceso descrito anteriormente las nanopartículas son obtenidas como un precipitado de color negro.

Las reacciones químicas para la formación de Fe_3O_4 pueden ser descritas mediante las siguientes ecuaciones:



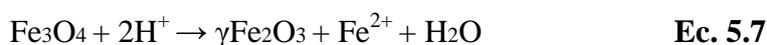
Cabe la posibilidad de sustituir el Fe^{2+} por Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} para generar óxidos mixtos o aleaciones [137-140].

Las condiciones mínimas necesarias para la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 son:

- pH de la disolución precursora entre 8 y 14
- relación estequiométrica 2:1 entre las sales de Fe^{3+} y Fe^{2+}
- síntesis bajo atmósfera inerte libre de oxígeno

Profundizando un poco más en la estequiometría de la magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{FeOFe}_2\text{O}_3$) nos damos cuenta que realmente se trata de un óxido mixto de Fe^{3+} y Fe^{2+} en relación (2:1), es decir, la misma relación empleada durante la síntesis.

De esta manera, el Fe^{2+} puede ser oxidado a Fe^{3+} aplicando una atmósfera o ambiente oxidante.



Por este motivo las nanopartículas de Fe_3O_4 no son muy estables en condiciones ambientales y medios ácidos, oxidándose fácilmente y generando $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (de color rojizo-parduzco). Sin embargo, la oxidación de la Fe_3O_4 para generar $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a priori no presenta un problema para nuestro propósito ya que la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ también es ferrimagnética con valores de susceptibilidad magnética ($632 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$) muy próximos a los valores de la Fe_3O_4 ($674 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$).

El tamaño, distribución, forma y composición de las nanopartículas dependerán de factores tales como: (1) tipos de sales utilizadas en la síntesis (cloruros, sulfatos, nitratos), (2) relación $\text{Fe}^{3+} : \text{Fe}^{2+}$, (3) temperatura de reacción, (4) valor de pH, (5) tipo de base empleada para generar el medio básico (NaOH, KOH, NH_4OH), (6) velocidad de agitación, (7) presencia de agentes quelantes o poliméricos (8) fuerza iónica del medio de trabajo, (9) velocidad de adición de la disolución, (10) orden de adición (disolución de sales de hierro sobre la disolución básica o al revés), (11) flujo y burbujeo de gas inerte durante la síntesis, etc.

Dependiendo de las condiciones de síntesis y sus posibles variantes se pueden obtener NPMs con tamaños comprendidos entre 5 y 100 nm y con mayor o menor variabilidad

de tamaño. A continuación, se explicarán en detalle cómo afectan algunos de estos factores.

Los valores óptimos de concentración de Fe en disolución oscilan entre 39 y 78 mM. Por otro lado, el incremento en la relación $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ favorece la formación de partículas grandes de hidróxido como precursor de Fe_3O_4 , lo que en definitiva incrementa el tamaño de las nanopartículas. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas de Fe_3O_4 se pueden controlar mediante el ajuste de la relación $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$.

La adición de aniones orgánicos quelantes, tales como, iones carboxilato (ácido láurico, cítrico, o ácido oleico) o agentes poliméricos (dextrano, carboxidextrano, almidón, o alcohol polivinílico), pueden ayudar a controlar el tamaño de las nanopartículas, así como, evitar su oxidación posterior en contacto con el aire.

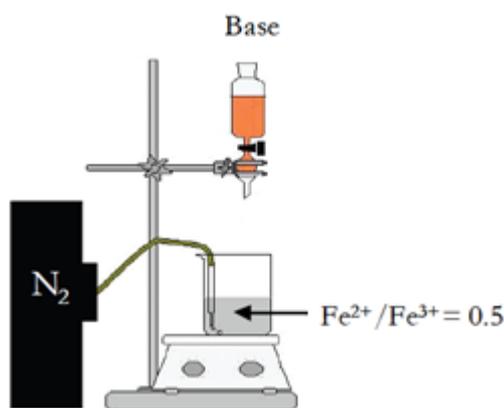


Figura 5.6 Montaje experimental de la síntesis de nanopartículas por coprecipitación.

Normalmente, la síntesis a temperaturas inferiores a 60°C produce un oxihidróxido hidratado amorfo que puede convertirse fácilmente en Fe_2O_3 , mientras que a temperaturas de reacción más altas ($> 80^\circ\text{C}$) se favorece la formación de Fe_3O_4 .

La naturaleza de la base también afecta al tamaño de las nanopartículas. Por ejemplo, utilizando NH_4OH en lugar de NaOH , se obtiene una mejor cristalinidad, mayor magnetización de saturación y menor tamaño de nanopartícula.

El incremento de la fuerza iónica de las disoluciones precursoras (por ejemplo en presencia de NaCl 1 M) produce nanopartículas más pequeñas con valores de magnetización de saturación inferiores que las sintetizadas en disoluciones con menor fuerza iónica.

El burbujeo de gas inerte a través de la solución protege de la oxidación de las nanopartículas de magnetita, además de reducir el tamaño de partícula en comparación con métodos donde no se ha eliminado el oxígeno atmosférico tanto de las disoluciones precursoras como del contenedor de reacción.

De la misma manera, el aumento en la velocidad de agitación también tiende a disminuir el tamaño de partícula.

Habitualmente, la adición de la disolución alcalina sobre la disolución de sales de hierro se realiza lentamente, gota a gota con agitación vigorosa. Se parte de una disolución de sales de hierro ligeramente ácida, donde el valor de pH es incrementado lentamente con la adición de NaOH . Cuando el pH es suficientemente alcalino $\text{pH} \sim 12$, comienza la formación de un precipitado oscuro que indica la aparición de nanopartículas de magnetita.

5.5.2.2 Coprecipitación química por inyección rápida

La coprecipitación química por inyección rápida difiere de la coprecipitación convencional en la velocidad a la que el pH de la disolución de sales de hierro es incrementado. En este caso, el objetivo es favorecer la formación de magnetita

bruscamente, mecanismo explosivo, mediante la adición brusca de la disolución de sales de hierro en la disolución básica convenientemente agitada.

5.5.2.3 Coprecipitación química en condiciones de reflujo y envejecimiento

La coprecipitación química en condiciones de reflujo y envejecimiento se desarrolla en varias etapas. Inicialmente, se prepara y calienta una disolución de hierro trivalente a 80°C bajo condiciones de reflujo durante 2 horas. En esta etapa se forma un precipitado de color amarillento consecuencia de que el Fe^{3+} se hidroliza formando un óxido-hidróxido de hierro trivalente (FeOOH). Posteriormente, se prepara una disolución de Fe^{2+} y urea. Finalmente, esta disolución se mezcla con el precipitado obtenido anteriormente y se calienta a una temperatura alrededor de 90-96°C durante 20 horas bajo condiciones de reflujo. El pH necesario para la formación de las nanopartículas se obtiene gracias a la lenta descomposición de la urea.



En estas condiciones, el incremento de pH es considerablemente más lento que el obtenido en los métodos anteriores. Por lo tanto, el incremento uniforme y lento de pH hace que se generen nanopartículas mucho más grandes, ya que se favorece la etapa de crecimiento cristalino.

5.5.2.4 Micelas inversas y micro-emulsión

Este método emplea agentes tensioactivos anfóteros para crear estructuras micelares invertidas-esféricas en disolventes no polares. De esta manera, se forman espontáneamente nanogotas de diferentes tamaños, micelas (1-10 nm) o emulsiones de agua en aceite (10-100 nm). En el interior de estas nanogotas, formadas por una capa de

surfactante que separa el interior de una disolución orgánica exterior, se encuentra encapsulada la disolución acuosa que contiene las sales de hierro. Por lo tanto, este sistema actúa como nanoreactor para sintetizar nanopartículas. Bajo estas condiciones se proporciona un aislamiento que limita la nucleación de partículas y el crecimiento. La principal ventaja del método de micela inversa o tecnología de emulsión es la gran diversidad de nanopartículas que se pueden obtener variando la naturaleza o cantidad de agente tensioactivo y co-tensioactivo, la fase aceite, o las condiciones de reacción. Finalmente, el tamaño de las nanopartículas se puede controlar seleccionando adecuadamente la temperatura de trabajo y la concentración de tensioactivo presente en la disolución precursora.

5.5.2.5 Termólisis

Este método consiste en descomponer térmicamente a altas temperaturas (superiores a 200 °C) un precursor organometálico que contenga hierro. Esta aproximación mejora significativamente el control del tamaño medio, así como, la distribución y cristalinidad de las nanopartículas. En este proceso la naturaleza del disolvente, temperatura y tiempo de reacción son los parámetros que más influyen al tamaño y morfología de las nanopartículas generadas. Como ejemplo, podemos citar la descomposición térmica $\text{Fe}(\text{CO})_5$ en disoluciones de óxido de trioctilfosfina (TOPO) y ácido oléico a una temperatura de 340 °C.

5.5.2.6 Reacción hidrotermal

Estas reacciones se llevan a cabo en medios acuosos y se realizan en reactores o autoclaves donde la presión puede estar por encima de los 2.000 psi³ y la temperatura supera los 250°C. Existen dos métodos o rutas sintéticas ampliamente utilizadas: (1)

³ libra-fuerza por pulgada cuadrada

hidrólisis y oxidación o (2) neutralización de hidróxidos metálicos mixtos. Estas dos reacciones son muy similares a excepción de que sólo son utilizadas sales de hierro en el primer método. En este proceso, las condiciones de reacción, disolvente, temperatura, y tiempo de reacción, por lo general tienen efectos importantes sobre los productos. El tamaño de partícula se controla principalmente mediante los procesos de velocidad de nucleación y crecimiento de grano.

5.6 Funcionalización y estabilidad de las NPMs

Las NPMs están formadas por elementos magnéticos como hierro, cobalto, níquel y sus óxidos. Un problema intrínseco e inevitable que presentan estas partículas es que tienden a formar agregados con el tiempo para intentar reducir la energía asociada, debido a la elevada relación área superficial/volumen que poseen. Además, las partículas que carecen de un recubrimiento externo son muy activas químicamente y se oxidan fácilmente en contacto con el aire. Esto puede generar capas delgadas de óxidos que originan una pérdida de magnetismo y capacidad de dispersión. Por ello, se hace necesario en la mayoría de las aplicaciones recubrir y/o proteger la superficie, durante o después de la síntesis. Estas estrategias comprenden la inserción o el recubrimiento con especies orgánicas, tales como, tensioactivos, polímeros o recubrimientos de capas inorgánicas, como sílice o carbón. De esta forma, los tensioactivos o polímeros se emplean a menudo para inactivar la superficie de las nanopartículas durante o después del proceso de síntesis. La generación *in situ* de la capa protectora puede ayudar al crecimiento y control del tamaño de las nanopartículas, generalmente por interacción de repulsión electrostática o repulsión estérica, manteniendo las nanopartículas en un estado coloidal estable (estabilización de las NPMs sintetizadas en suspensión). Además, los tensioactivos o polímeros se pueden anclar químicamente o adsorber físicamente a las NPMs para formar una capa simple o doble, lo que genera fuerzas

repulsivas (principalmente como repulsión estérica) para equilibrar las fuerzas de atracción magnética y de Van der Waals que actúan sobre los NPMs. Por otro lado, para usos biomédicos es necesario que las NPMs sean estables en medio acuoso a pH fisiológico (pH= 7.4). Así, la estabilidad coloidal de dichas nanopartículas dependerá de su punto isoeléctrico, así como, de la funcionalización presente en su superficie (interacción electrostática y estérica)

5.7 Bioconjugación o biofuncionalización

Las NPMs tipo *core-shell* se pueden considerar partículas formadas por un núcleo cristalino inorgánico (con propiedades magnéticas) y una cáscara superficial de grupos funcionales (p. ej. -OH, -COOH, -NH₂, -C=O, etc). La cubierta suele ser rica en grupos funcionales. Comúnmente es utilizada como matriz de inmovilización para otras moléculas o biomoléculas más complejas con funciones más específicas, como por ejemplo, el reconocimiento molecular o actividad catalítica.

La bioconjugación puede ser definida como una técnica de modificación que permite anclar en la superficie de un de un material (ver **Figura 5.7**), generalmente sintético, material biológico. Para biofuncionalizar las NPMs se pueden utilizar un número considerable de receptores biológicos tales como: proteínas, ligandos, anticuerpos, enzimas, aptámeros, ADN, etc., que *a posteriori* puede ser empleados como elementos de bioreconocimientos o centros catalíticos en donde ocurre una reacción química o bioquímica.

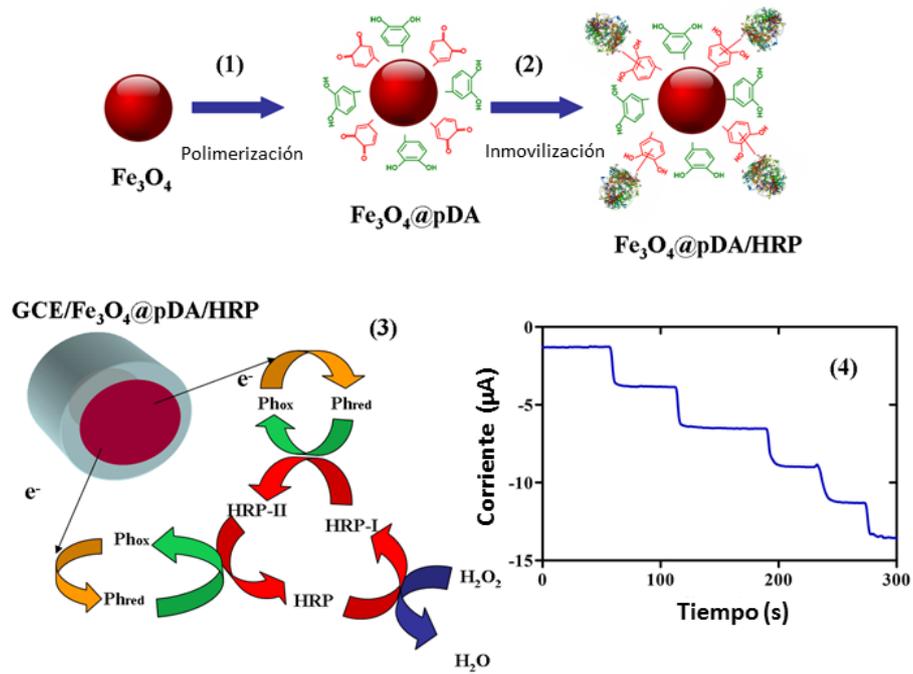


Figura 5.7 (1) Esquema de funcionalización e inmovilización enzimática (2). Mecanismo de reacción enzimáticas (reacción por desplazamiento) en la superficie sensora (3) respuesta enzimática frente a adiciones de peróxido de hidrógeno (4).

POLIDOPAMINA

6.1 Introducción

Durante las últimas décadas ha sido objeto de estudio el revestimiento y modificación de superficies que puedan otorgar protección a los materiales subyacentes, debido a la aparición de nuevas propiedades superficiales y funcionales [141-143]. Para el desarrollo de biosensores o biodispositivos es necesario utilizar superficies altamente biocompatibles que además, sean capaces de incrementar la cantidad y estabilidad del material biológico retenido. Existen aproximaciones para realizar este tipo de modificaciones, entre las que destacan conjugación química, hidrólisis, desarrollo capas ensambladas, tratamiento de plasma, etc. Normalmente, estos métodos requieren mucho tiempo, suelen ser complicados, o no son aplicables a todas las superficies[144-146]. Por lo tanto, existe un gran interés por encontrar métodos que permitan modificar las superficies de los materiales de manera sencilla y eficaz. Sin embargo, la naturaleza siempre ofrece oportunidades. Así, la investigación de métodos de adaptación utilizados por organismos vivos a su entorno ha proporcionado información valiosa. De esta manera, la observación de la adhesión de mejillones a una gran diversidad de superficies, condujo a un importante avance en el campo de la ciencia de los materiales[147-149]. Los mejillones pueden adherirse con fuerza a diversos sustratos, incluso a superficies mojadas. Diversos estudios han demostrado que la presencia de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (DOPA) y varias proteínas ricas en lisina son los principales responsables de la extraordinariamente robustez de adhesión que los caracteriza.

En base a estos hallazgos, el grupo de *Messersmith* presentó en 2007 su primera publicación sobre la obtención de polidopamina (pDA). La dopamina (DA), presenta una estructura molecular similar a la DOPA y ha acaparado la atención como nuevo material de revestimiento [150].

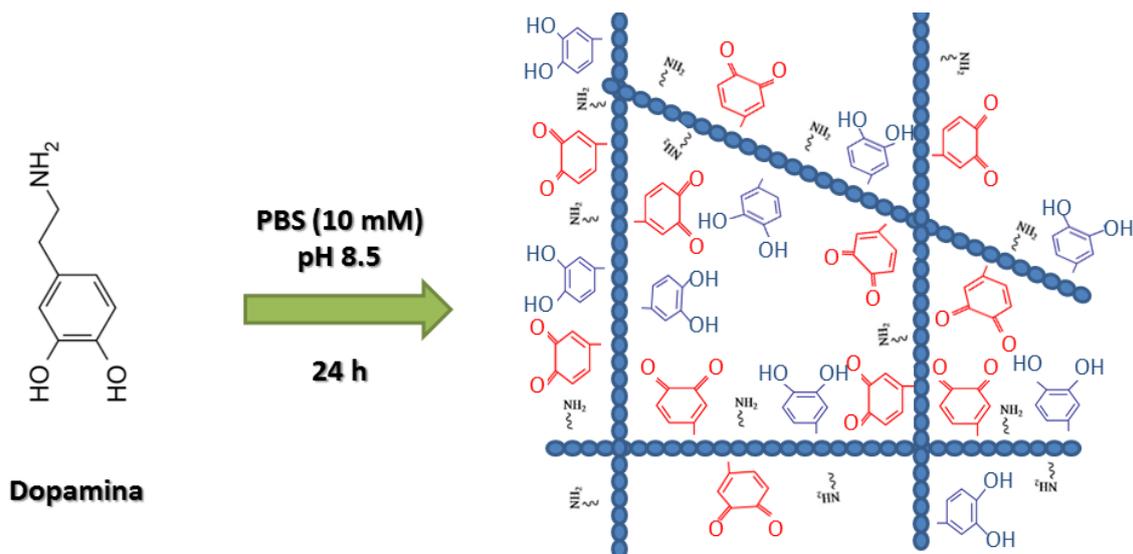


Figura 6.1 Polimerización de DA y formación de la red polimérica de pDA con restos aminos (NH_2), grupos catecoles (C-OH , azul) y quinonas (C=O , rojo).

6.2 Dopamina

La DA es un neurotransmisor producido por una amplia variedad de animales, incluidos vertebrados e invertebrados. Está relacionada con muchos procesos fisiológicos y trastornos neurofisiológicos como, la esquizofrenia, el Parkinson y el Alzheimer, así como, varios comportamientos sociales y adictivos [151-153]. La DA es una feniletilamina, una catecolamina que cumple funciones neurotransmisoras en el sistema nervioso central. Se produce en diversas zonas del sistema nervioso, especialmente en la sustancia *nigra* o el hipotálamo, actuando como una neuro-hormona e inhibiendo la liberación de prolactina del lóbulo anterior de la hipófisis.

6.3 Ventajas y aplicaciones de la polidopamina

La principal ventaja que presenta la pDA en el desarrollo de biosensores es que puede ser polimerizada fácilmente en prácticamente cualquier tipo de sustrato inorgánico u orgánico, incluyendo superficies superhidrófobas [150, 154]. El espesor de film

depositado puede ser controlado fácilmente y posee gran estabilidad química y mecánica. Otra característica importante radica en su estructura química, ya que posee numerosos grupos funcionales tales como, catecoles, aminas, iminas y quinonas [155] que pueden servir para retener covalentemente moléculas de interés o material biológico (enzimas, anticuerpos, ADN, aptámeros, células, etc.) [156-160]. Por otro lado, en protocolos de bioremediación facilita la retención de iones de metales de transición [161], mejora los procesos de biomineralización [162-164] y su carácter reductor permite reducir espontáneamente el Au^{3+} y Ag^+ para generar espontáneamente nanopartículas en superficie [165-168]. Las grandes ventajas que presenta la pDA han hecho que haya irrumpido con fuerza en un gran número de aplicaciones, en áreas como la química, biología, medicina, materiales, ingenierías de las ciencias aplicadas y tecnologías.

6.4 Síntesis de polidopamina

A día de hoy, el método de síntesis de pDA más ampliamente utilizado es la oxidación de DA en disolución ligeramente alcalina ($\text{pH} > 8.5$). De esta forma, el monómero DA es oxidado y autopolimerizado espontáneamente usando el oxígeno como agente oxidante. El proceso de auto-polimerización se trata de una reacción suave y sencilla que no precisa de instrumentación sofisticada, condiciones de reacción extremas o sustancias contaminantes peligrosas. La polimerización se produce de manera inmediata cuando añadimos más de 2 mg/ml de DA (monómero) a una disolución alcalina. Esta reacción muestra cambios de color, pasando inicialmente de incolora a ligeramente rosa y finalmente a marrón pálido u oscuro dependiendo de la concentración y el tiempo de reacción. El espesor de la película depositada puede ser controlado mediante la regulación de concentración de DA y el tiempo de polimerización pudiendo llegar a alcanzar espesores aproximadamente de 50 nm para tiempos de reacción entre 24-48 h.

Algunos autores, han reportado un nuevo método de polimerización de DA menos contaminante para el medio ambiente mediante el empleo de enzimas [169]. La formación de melanina en los organismos se lleva a cabo mediante oxidación catalítica de L-tirosina por la enzima *tirosinasa*. Por otro lado, la *lacasa*, es una enzima ampliamente utilizada para la degradación catalítica de compuestos polifenólicos en aguas residuales de procesos industriales. Recientemente, se han presentado trabajos sobre polimerización enzimática de compuestos de derivados fenólicos y aminas [170, 171]. La polimerización de DA mediante el uso de enzimas ofrece como ventajas que puede ocurrir a pH 6 y el atrapamiento de dicha enzima en la matriz polimérica, conservando intactas tanto su actividad enzimática como su estructura [170], para su posterior uso como sustrato biocatalítico.

Alternativamente, también ha sido empleada con éxito la electropolimerización de DA mediante voltametría cíclica incluso en disoluciones desoxigenadas [172]. Mediante este protocolo se han conseguido películas poliméricas de mayor espesor en comparación con los métodos citados anteriormente. Aunque este método presenta una gran simplicidad y eficacia, todavía existen algunas limitaciones inherentes, ya que requiere que el material a recubrir sea eléctricamente conductor.

6.5 Mecanismo de polimerización

Aunque la pDA puede sintetizarse fácilmente, el complejo mecanismo de síntesis ha sido tema de debate científico durante años, debido principalmente al enorme número de reacciones redox que tienen lugar y a la gran cantidad de productos intermedios generados durante la polimerización.

Inicialmente, se pensó que la formación de pDA seguía un mecanismo similar a la síntesis de melanina (eumelanina) en los organismos vivos [173-177]. Según esta teoría,

la DA sería originariamente oxidada, en condiciones alcalinas, a dopamina-quinona, seguido de una ciclación intramolecular, generando leucodopaminocromo mediante adición tipo Michael entre los carbonos 1,4 [178]. Seguidamente, ocurriría la oxidación de este intermedio y su posterior reagrupamiento estructural, generando 5,6-dihidroxiindol, para luego oxidarse fácilmente a 5,6-indolquinona. Finalmente, los intermedios de reacción serían capaces de experimentar reacciones de ramificación en las posiciones 2, 3, 4, y 7 para dar lugar a la formación de múltiples isómeros de dímeros y eventualmente, oligómeros superiores que podrían autoensamblarse mediante reacciones de dismutación inversa entre los grupos catecoles y o-quinona generando el polímero reticulado. Sin embargo, el modelo "eumelanina" muestra poca evidencia experimental.

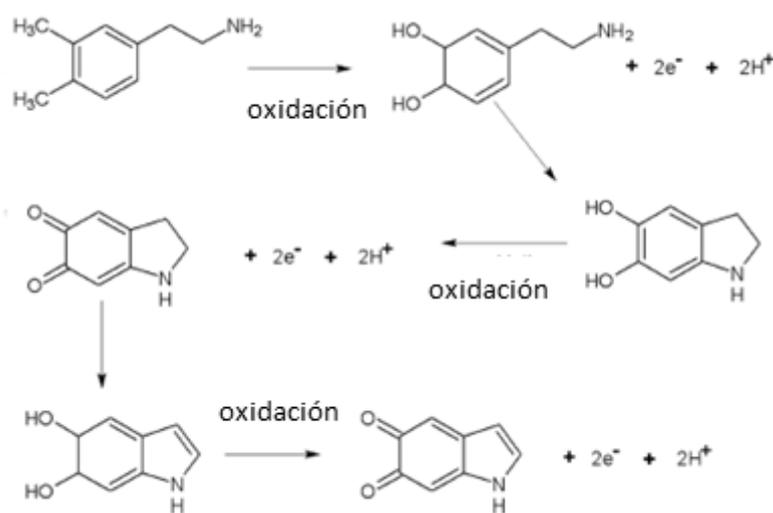


Figura 6.2 Primeros pasos propuestos para la formación de la polidopamina.

En marcado contraste con el modelo de "eumelanina", el cual prevé un esqueleto polimérico con base en los enlaces covalentes entre los anillos de arilo de los monómeros, Bielawski y colaboradores (mediante espectroscopia de estado sólido y técnicas cristalográficas) han propuesto un nuevo mecanismo para la síntesis de pDA [179].

Estos autores, mediante el empleo de técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido y ^{15}N , pudieron confirmar la formación de intermedios de reacción cíclicos y especies nitrogenadas de tipo indol e indolina. Estos datos corroboraban el modelo anterior, pero el análisis de RMN de ^{13}C mostraba que las especies cíclicas nitrogenadas eran adscritas a una estructura indolina saturada, en lugar de una estructura de indol insaturado, como proponía el modelo anterior. Por lo tanto, plantearon que la estructura polimérica de la pDA se formaba por agregación de monómeros (DA) reticulados a través de fuerzas no covalentes fuertes, incluyendo enlaces por puentes de hidrógeno, transferencia de carga y apilamiento mediante enlaces tipo π , similares a los existentes en polímeros supramoleculares sintéticos o biológicos.

Paralelamente a estos modelos, Lee y colaboradores sugirieron la formación de pDA como resultado de la combinación de auto-ensamblaje no covalente y polimerización covalente del monómero [180]. Mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), identificaron gran cantidad de DA sin polimerizar que a su vez, formaba un complejo auto-ensamblado con el producto oxidado, 5,6-dihidroxiindol (DHI).

Otra propuesta formulada por Vecchia y colaboradores, integra los nuevos conceptos obtenidos con el modelo anterior [181]. Estos autores sugieren que la formación de pDA puede ocurrir por tres mecanismos simultáneos y competitivos. Así, la estructura de la pDA dependería de las condiciones (concentración de DA, tampón y pH) a la que transcurre la reacción de polimerización. Los datos obtenidos de RMN (^{15}N , ^{13}C) y UV-visible variaban significativamente en función de las condiciones de síntesis. Por ejemplo, a baja concentración DA (0.5 mM), la quinona es generada lentamente, dando lugar a una mayor proporción de unidades de indol ciclado (DHI). Por otro lado, a mayor concentración de DA de partida (10 mM), la quinona generada por autooxidación

puede ser atrapada de manera eficiente por la DA, dando lugar a un aumento de la cantidad de elementos no ciclados. El estudio de espectros de RMN de ^{13}C empleando tampón TRIS (hidroximetil)-aminometano, en lugar de tampones fosfato o NaHCO_3 , mostraron incorporación significativa de TRIS a la estructura polimérica a concentraciones relativamente bajas de monómero. Otra fortaleza del mecanismo propuesto por Vecchia y colaboradores es que muchos grupos funcionales tipo indoles, aminos, ácido carboxílicos, catecoles, quinonas y sistemas tipo π indólico/catecólicos son integrados en la estructura polimérica. Este resultado, además de explicar la excelente capacidad adhesiva de la pDA a prácticamente cualquier tipo de superficie, también nos da una idea de la excelente plataforma que supone la pDA tanto para añadir otras funcionalidades como para retener material biológico en superficie. Además, de la concentración de DA y tipo de tampón utilizado, también es importante prestar atención al pH de la disolución empleada [182]. Cuando el pH de la disolución aumenta de 5 a 8.5, el espesor de la película depositada aumenta gradualmente, estabilizándose a valores de pH superiores a 8.5. Por otro lado, otro factor importante en la formación de pDA es el uso de agentes oxidantes en la disolución de polimerización. El oxígeno es utilizado frecuentemente como agente oxidante en el proceso de polimerización de pDA, participando en la oxidación inicial de la dopamina, así como, en la conversión de 5,6-dihidroxiindol en quinona mediante abstracción de hidrógeno. Recientemente, ha sido confirmado que la dopamina no es capaz de polimerizarse en disoluciones que hayan sido desoxigenadas previamente, aunque se encuentre en un ambiente fuertemente alcalino [183]. Finalmente, también se ha demostrado que oxidantes del tipo persulfato de amonio, periodato, perclorato de sodio e iones metálicos pueden ser eficazmente empleados en la polimerización de la DA [184, 185].

6.6 Aplicación de polidopamina en el desarrollo de biosensores: inmovilización de enzimas y anticuerpos

Desde el punto de vista electroquímico y electroanalítico, la pDA ofrece un microentorno idóneo para la inmovilización de una gran densidad de biomoléculas sobre la superficie sensora. El material es anclado firmemente mediante enlace covalente lo que permite conservar la estructura tridimensional y la actividad biológica (reconocimiento anticuerpo-antígeno, reacción enzima-sustrato).

Desde el punto de vista mecanístico, la red de pDA es polimerizada mediante la formación de *bases de Schiff* y/o *adiciones tipo Michael*, donde los grupos quinonas (-C=O) formados a partir de la oxidación de los grupos catecoles (-C-OH) de la DA, reaccionan con el grupo amino primario (-NH_2) de otra molécula [186-188]. Estos son los mismos mecanismos empleados para la inmovilización de enzimas, anticuerpos y material biológico, sobre la superficie de la pDA.

6.6.1 Base de Schiff

Una base de Schiff es un grupo funcional que contiene un doble enlace carbono-nitrógeno, donde el átomo de nitrógeno está conectado a un grupo arilo o alquilo sin hidrógeno. La fórmula general es $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{N-R}_3$, donde R_3 es un grupo arilo o alquilo que convierte a la base de Schiff en imina estable.

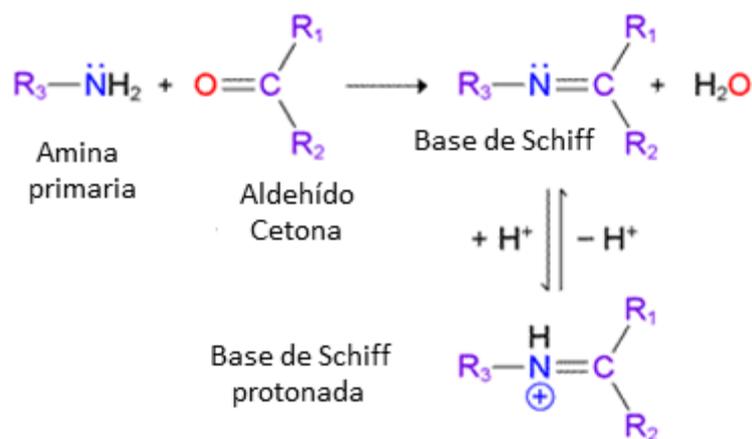


Figura 6.3 Mecanismos de adición y formación de una base de Schiff.

6.6.2 Adiciones tipo Michael

La adición de Michael consiste en una adición nucleófila de un carbanión a un compuesto carbonílico α , β -insaturado. Es decir, se transforma un carbono sp^2 en un carbono sp^3 mediante adición nucleófila al carbono β de un alqueno electro-deficiente.

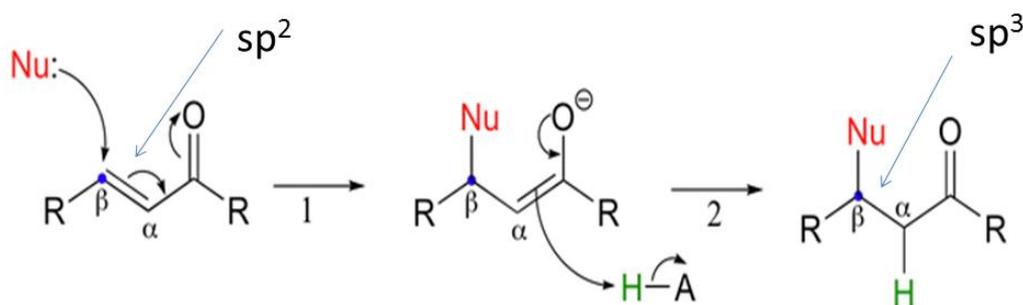


Figura 6.4 Mecanismos de adición nucleofílica (adición de Michael).

6.7 Conclusiones

La utilización de pDA, en protocolos de inmovilización, para el desarrollo de biosensores resulta un método novedoso, sencillo y beneficioso principalmente debido a la posibilidad de su polimerización formando redes complejas con grupos reactivos libres y disponibles para ser utilizados en posteriores reacciones químicas.

Por otro lado, los grupos catecoles residuales presentes en la estructura son los responsables de la fuerte adhesión polimérica a cualquier tipo de superficie orgánica (polisulfona [189], polipirrol [190]) e inorgánica (arcillas [191], nanopartículas de hierro [192, 193], oro [194], SiO₂ [195, 196]).

Cabe destacar que la pDA también ha sido empleada en el desarrollo de polímeros de impresión molecular (PIMs) para el reconocimiento de proteínas dada su capacidad de formación de una red compacta, fácilmente adaptable y con posibilidad de establecer interacciones débiles [197].

La presencia de grupos quinona residuales sobre la estructura del polímero permite el desarrollo de procesos de derivatización, donde la superficie modifica sus propiedades físico-químicas y mecánicas, en función del tipo de modificación realizada.

Sin embargo, para el desarrollo de biosensores, posiblemente sea más interesante la formación de *bases de Schiff* y *adiciones tipo Michael* en la superficie del polímero. Dichas reacciones forman enlaces covalentes con restos *aminas*, *tioles* y grupos *imidazoles* de la histidina que permiten, a su vez, la inmovilización de material biológico en superficie.

La mayoría de los biosensores desarrollados mediante el uso de la pDA han sido elaborados aplicando tres tipos de enfoques distintos:

- (i) encapsulación directa de la biomolécula durante la polimerización de la dopamina (biosensor)
- (ii) posterior modificación de la biomolécula de interés sobre el polímero (biosensor)
- (iii) uso de transductores modificados directamente con pDA para la detección del analito de interés (sensor)

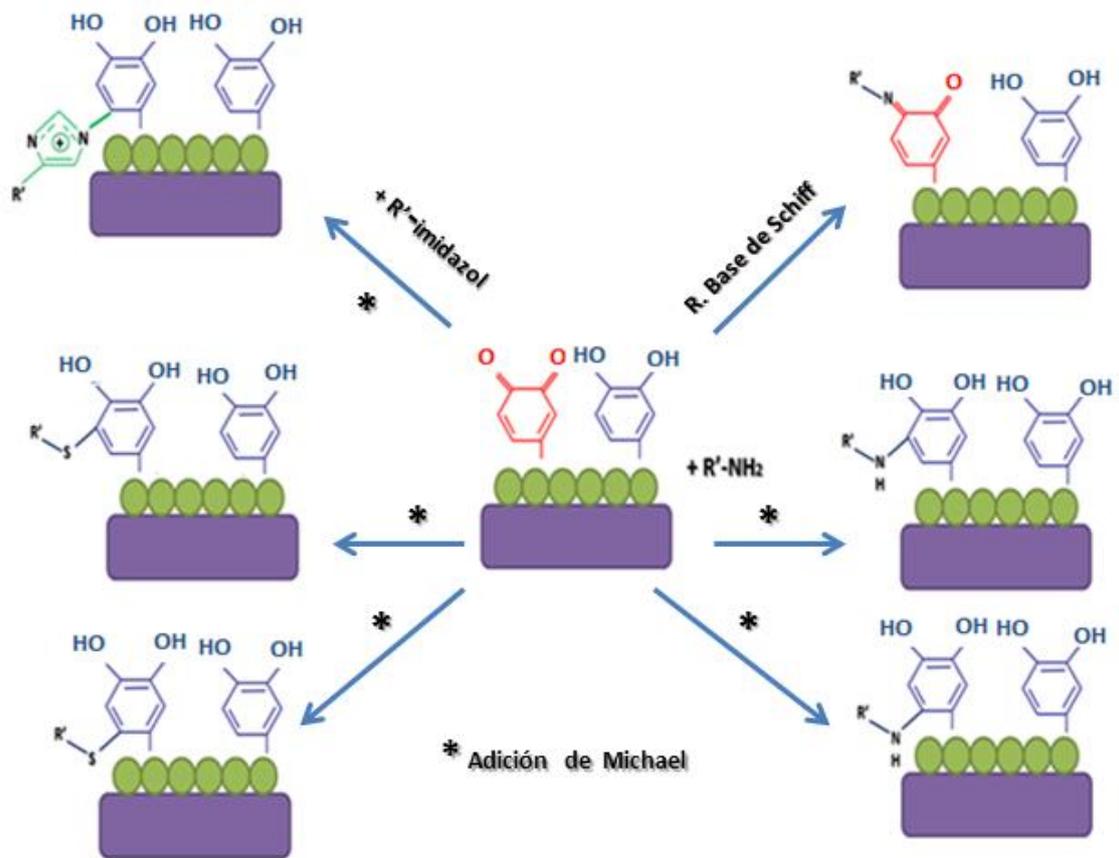


Figura 6.5 Posibles mecanismos de inmovilización vía quinona con restos aminos, tioles e imidazoles donde R' es un resto orgánico o biomolécula.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Todos los reactivos y enzimas han sido suministrados por la compañía *Sigma-Aldrich* y usados sin previa modificación y/o purificación. Cada reactivo ha sido almacenado en las condiciones recomendadas por la casa comercial. Los anticuerpos fueron suministrados por la casa comercial *AbCam*. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua ultrapura (*Milli-Q/Millipore*) y conservadas en nevera mientras que no eran usadas. Las disoluciones de reactivos poco estables (H_2O_2 , *polifenoles*, interferentes, dopamina, etc.) se prepararon previo uso. Las disoluciones enzimáticas y calibrado de biosensores han sido realizados en tampón fosfato salino (PBS, pH = 7.4)

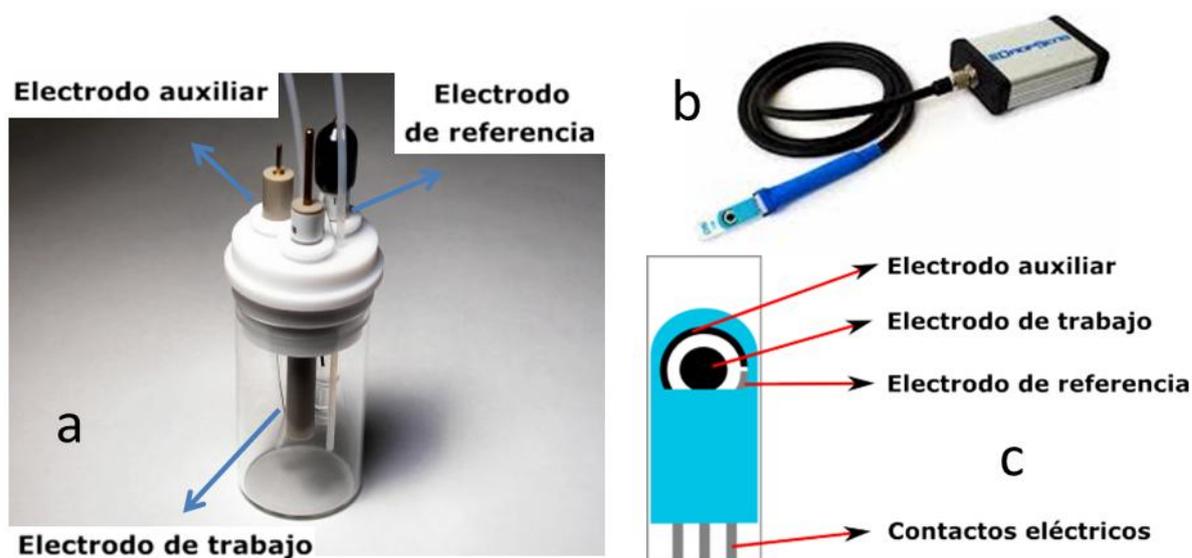


Figura 7.1 a) Montaje experimental de un electrodo de carbono vitrificado (GCE). b) Montaje experimental del potencioestado μ STAT 200 conectado a tarjeta serigráfica. c) Detalle de la configuración de una tarjeta serigráfica (SPCE).

Los electrodos serigráficos de pasta de carbono (SPCEs) modelo DRP-110 y DRP-710 fueron suministrado por la empresa española *Dropsens*. Los electrodos de carbono vitrificado (GCEs) fueron obtenidos de la casa comercial *CH Instruments (CHI)*. El GCE modificado con un imán de neodimio fue cedido por el grupo de electroanálisis de

la *Universidad Complutense de Madrid*. Todos los experimentos electroquímicos fueron realizados con un potenciostato μ STAT 200 (*Dropsens*).

7.2 Métodos de caracterización de Materiales

Durante el desarrollo de la presente tesis se han empleado diversas técnicas instrumentales para caracterizar las nanopartículas sintetizadas, así como, sus posteriores modificaciones. Algunas de estas técnicas han sido usadas en el laboratorio de Neuroquímica y Neuroimagen (CPA, Voltametría cíclica, Espectroscopía Visible-Ultravioleta), mientras que otras más específicas fueron realizadas en el Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la universidad de la Laguna, en la Universidad Complutense de Madrid y en el Instituto de Ciencias de Materiales de Sevilla (CSIC-Univ. de Sevilla).

Las técnicas voltamperométricas y de caracterización de materiales empleadas durante la presente tesis han sido: microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), difracción de rayos X (XRD), análisis térmico (TG, TDA, DSC), espectroscopía (Vis-UV, IR, Raman), medidas de susceptibilidad magnética, etc.

7.2.1 Voltamperometría

Las *técnicas potenciostáticas* o *voltamperométricas* son métodos que se realizan a potencial controlado. Estudian los procesos de transferencia de carga entre el electrodo de trabajo y el analito en disolución. Abarcan un grupo de metodologías electroanalíticas, donde la información sobre el analito es obtenida a partir de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones donde se favorece la polarización total de un electrodo indicador o de trabajo.

7.2.1.1 Procesos farádicos y no farádicos

El objetivo de las técnicas a potencial controlado es obtener una corriente que pueda ser relacionada con la concentración de analito de interés. Por esta razón, se mide la transferencia electrónica durante el proceso redox que sufre el analito en la superficie del electrodo de trabajo:



Donde **O** y **R** son la forma oxidada y reducida del par redox respectivamente y **n** es el número de electrones puestos en juego.

Cuando el analito cambia de estado de oxidación genera una corriente eléctrica denominada *corriente farádica*, por seguir las leyes de Faraday (*la oxidación o reducción de 1 mol de sustancia produce un cambio de 96.487 culombios*). Sin embargo, cuando se aplica un potencial a un electrodo pueden generarse corrientes de diferente naturaleza, *no farádicas*, debidas principalmente a los fenómenos de adsorción y desorción concomitantes al transporte de carga generados en la *doble capa eléctrica* entre la interfaz electrodo-disolución.

Las concentraciones de reactantes y productos existentes vendrán especificados por la *ecuación de Nernst*:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Donde **E** es el potencial aplicado, **E^o** es el potencial estándar, **R** es la constante de los gases ideales, **T** es la temperatura en grados Kelvin, **F** es la constante de Faraday, **C_O** es la concentración de la especie oxidada, **C_R** es la concentración de la especie reducida.

La corriente i_z registrada durante un experimento voltamperométrico, representa la velocidad v_z de reacción a la cual el analito se está oxidando/reduciendo en la interfase electrodo-disolución y viene expresada como:

$$v_z = \frac{i_z}{nF} \quad \text{Ecuación 7.3}$$

Generalmente, la velocidad de la reacción es normalizada respecto a la superficie (A) del electrodo de trabajo ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) quedando:

$$J_z = \frac{i_z}{A} = \frac{i_z}{nFA} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

La velocidad de reacción viene gobernada por una serie de procesos tales como: (1) *transferencia de masa* del analito y sus productos de reacción hacia y desde la superficie del electrodo; y (2) velocidad de *transferencia electrónica* sobre la superficie del electrodo.

A continuación, se definen brevemente cada uno de ellos.

7.2.1.2 Fenómenos de transporte transferencia de masa

Para que la sustancia electroactiva se oxide o reduzca en la superficie del electrodo es necesario que el analito en el seno de la disolución alcance de alguna manera la superficie. El transporte de analito puede realizarse mediante tres tipos de mecanismos de transporte de masa. Dependiendo del tipo de mecanismo de transporte de masa existente se influirá en mayor o menor medida la velocidad con que los reactantes y productos se transporten desde y hacia la superficie del electrodo. Los procesos de transporte de masa pueden ser: *difusión*, *migración* y *convección*.

7.2.1.3 Transferencia electrónica

Reconsiderando la **ecuación 7.1**, el proceso de transferencia electrónica consiste en la transferencia de n electrones entre la banda de conducción del electrodo de trabajo y un orbital molecular de las especie oxidada o reducida (orbitales HOMO y LUMO respectivamente).

La velocidad de reacción *directa* (reducción) v_d es una reacción de primer orden:

$$v_d = k_d C_O \quad \text{Ecuación 7.5}$$

La reacción *inversa* (oxidación) v_i también es de primer orden:

$$v_i = k_i C_R \quad \text{Ecuación 7.6}$$

Donde k_d y k_i son las constantes de velocidad directa e inversa respectivamente. Estas constantes dependen de las condiciones experimentales de acuerdo a:

$$k_d = k^o \exp \left[-\frac{\alpha n F (E - E^o)}{RT} \right] \quad \text{Ecuación 7.7}$$

$$k_i = k^o \exp \left[\frac{(1-\alpha) n F (E - E^o)}{RT} \right] \quad \text{Ecuación 7.8}$$

Donde k^o es la *constante de velocidad estándar* y α es el *coeficiente de transferencia electrónico*. El valor de k^o (cm/s) indica la velocidad de reacción entre la superficie del electrodo y el reactante. El valor de α (comprendido entre 0 y 1) proporciona información sobre la simetría de la curva de energía libre (respecto a reactantes y productos). De esta forma α es una medida de la fracción de energía puesta en el sistema para reducir la energía de activación. Por lo tanto, para sistemas simétricos α tendrá un valor muy próximo a 0.5.

7.2.2 Técnicas voltamperométricas

Existe un gran número de técnicas que difieren en la forma en que el potencial es aplicado y en definitiva, la manera en que es medida la corriente. En el desarrollo de la presente tesis se han empleado: (1) Voltamperometría a potencial constante (CPA) o Amperometría y (2) Voltamperometría cíclica (CV).

7.2.2.1 Voltamperometría a potencial constante

En esta técnica el potencial es fijado a un valor donde ocurre la oxidación/reducción del analito de interés en régimen difusivo (*sin agitación mecánica y en presencia de una gran concentración de electrolito inerte*). Bajo estas condiciones, la corriente registrada alcanza un valor máximo (*corriente límite i_L*). Normalmente, esta técnica permite la detección de moléculas o iones a concentraciones próximas a 10^{-9} M.

Al aplicar un potencial constante se genera una *contribución no farádica inicial* que cae a cero rápidamente, debida a la contribución capacitiva de la doble capa eléctrica. Transcurrido el momento inicial, la corriente generada es función de la concentración de analito. Admitiendo que i_L es de origen difusivo y que durante el proceso de medida se consume poca cantidad de analito (concentración del analito constante), se puede asumir que se alcanza el estado estacionario (*steady-state*). Bajo las condiciones de estado estacionario i_L es directamente proporcional al coeficiente de difusión y concentración del sustrato:

$$i_L = \frac{nFACD}{r} G \quad \text{Ecuación 7.9}$$

Donde C es la concentración del analito, D es el coeficiente de difusión, r es el radio del electrodo y G es un factor geométrico

7.2.2.2 Voltamperometría cíclica

En voltametría cíclica (CV), el potencial aplicado varía linealmente (**Figura 7.2a**) con el tiempo desde un valor inicial (E_i) hasta un valor final (E_f). Una vez alcanzado el valor E_f el sentido de barrido es invertido y generalmente, el potencial vuelve a su valor inicial. El intervalo de potencial elegido es aquel en el que tenga lugar la oxidación o reducción del analito de interés. Las condiciones de trabajo son aquellas que aseguren el transporte de analito a la superficie del electrodo por difusión. La dependencia entre la velocidad de barrido y amplitud del pico explica el papel de la *adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas* dentro del proceso en estudio (ejemplo reacciones catalíticas tipo EC').

La **figura 7.2b** muestra la respuesta de un sistema reversible, en el cual se pueden observar los distintos parámetros característicos: potencial del pico catódico (E_{pc}), potencial del pico anódico (E_{pa}), intensidad de pico catódico (i_{pc}) e intensidad de pico anódico (i_{pa}). Al iniciar la VC no se observa intensidad de corriente apreciable (A), debido a que no hay especies oxidables en esa zona de potencial. Cuando el potencial aumenta hasta valores próximos a E_{pa} , se desarrolla una intensidad anódica correspondiente a la oxidación de R en la superficie del electrodo. La intensidad de pico (i_{pa}) es debida a dos componentes: (1) intensidad inicial necesaria para ajustar la concentración superficial de reactivo a la concentración de equilibrio dada por la ecuación de Nernst e (2) *intensidad controlada por difusión*. La primera, disminuye rápidamente a medida que la capa de difusión se extiende hacia el exterior de la superficie del electrodo (corriente capacitiva). Luego, la altura de pico viene determinada en última instancia por el proceso difusivo. Como este es incapaz de suministrar reactivo suficiente, llegado un momento ocurre la caída de corriente posterior a i_{pa} , alcanzando así, la región (C). La intensidad catódica (i_{pc}) resultante de la

reducción de O acumulada cerca de la superficie del electrodo durante el barrido directo y el potencial catódico (E_{pc}), pueden explicarse del mismo modo para el barrido inverso. De esta forma, la corriente catódica genera un pico y después disminuye a medida que se consume la especie R acumulada en la superficie del electrodo. Para un sistema reversible se tiene que $I_{pc}/I_{pa} \sim 1$.

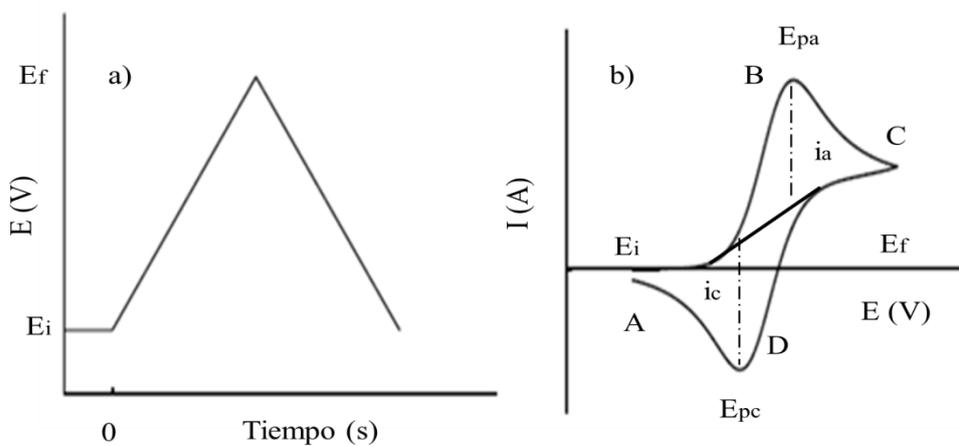


Figura 7.2 a) Variación del potencial aplicado en CV. **b)** Voltamperograma cíclico obtenido al ciclar un electrodo en presencia de un par redox.

Por otro lado, la separación entre dichos picos es función del número de electrones puestos en juego en la reacción de óxido/reducción, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_{pa} - E_{pc} = 59/n \text{ (mV)} \quad \text{Ecuación 7.10}$$

La ecuación matemática que cuantifica la intensidad de pico (asumiendo difusión plana), es la ecuación de *Randles-Sevcik*, que a 25 °C se escribe como:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 n^3 A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Ecuación 7.11}$$

Donde v es la velocidad de barrido. La intensidad de pico de corriente es proporcional a la concentración de especie electroactiva, a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y al coeficiente de difusión de analito.

7.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) es una técnica instrumental que permite analizar toda clase de superficies siempre que sean conductoras, de no ser así, es necesario recubrirlas con un material conductor, preferentemente oro. El microscopio de barrido electrónico utiliza electrones, en lugar de luz, para formar una imagen (lo que implica la necesidad de que la muestra sea conductora). El equipo cuenta con un dispositivo (*filamento de tungsteno, hexaboruro de lantano o un emisor de efecto de campo*) que genera un haz de electrones de alta energía (20-30 keV) para iluminar la muestra. Los electrones generados de la interacción con la superficie se recogen en diferentes detectores para crear una imagen que refleje las características superficiales de la muestra. Esta técnica puede proporcionar información de forma, textura y composición química. La incidencia de los electrones en la superficie puede producir fenómenos de transmisión, difracción, emisión de electrones secundarios, electrones Auger, retrodispersión, emisión de rayos-X, etc. Por esta razón, el microscopio puede ser usado en varios modos dependiendo del sistema de detección empleado.

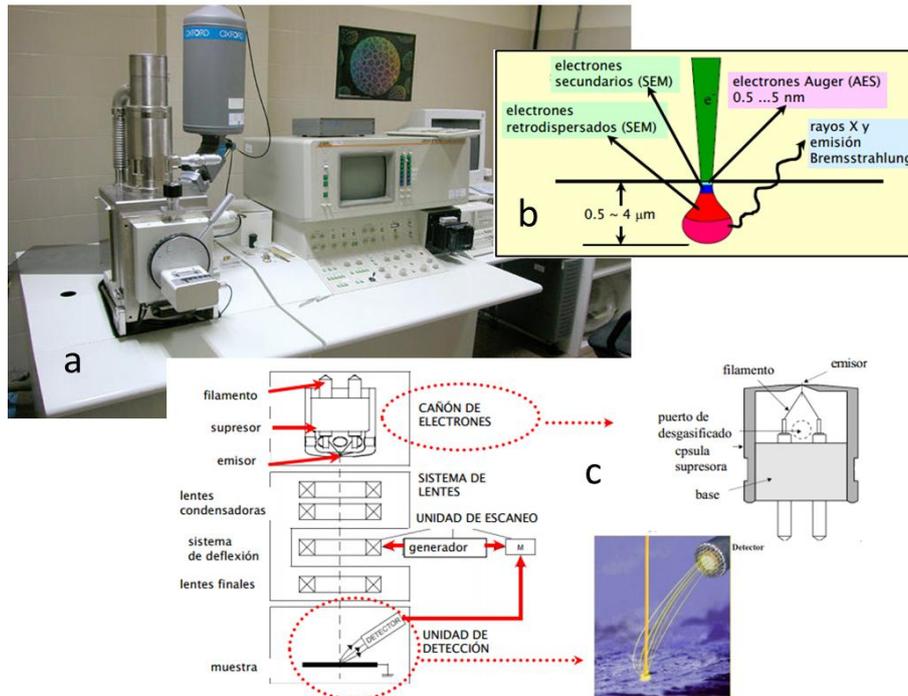


Figura 7.3. a) Fotografía de un microscopio de barrido electrónico. b) Resumen de algunos de los procesos derivados del bombardeo electrónico sobre un material. c) Esquema de los componentes principales.

En el modo emisor la señal detectada corresponde a electrones secundarios emitidos por la superficie de la muestra, donde aquellos caracterizados por una alta emisión secundaria son traducidos como puntos brillantes. La variación de intensidad da la sensación de relieve correspondiente a la topografía de la superficie analizada. Los nuevos microscopios SEM utilizan como fuente de electrones cañones de emisiones de campo (Field Emission Gun, FEG) lo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía que a su vez, permiten mejorar la resolución espacial, minimizar los efectos de cargas y causar menos daños en muestras sensibles.

A partir de los rayos-X emitidos es posible medir la energía de los rayos-X resultantes de la interacción entre los electrones de alta energía incidentes y la muestra. Los rayos-X resultantes dependerán de la naturaleza o composición de la muestra.

A continuación, se realiza una breve descripción de los detectores más utilizados:

1. *Detector de electrones secundarios (SE)*: ofrece imagen en blanco y negro de la topografía de la superficie examinada. Es la señal que ofrece mayor resolución.
2. *Detector de electrones retrodispersados (BSE)*: ofrece una imagen de superficie aunque de menor resolución. Presenta la ventaja de ser sensible a la variación del número atómico de los elementos presentes en la superficie. Se pueden observar distintos tonos de gris en función de los distintos elementos. Es decir, nos permite visualizar distintos elementos o compuestos en la superficie del material en función del brillo obtenido.
3. *Detector de rayos X (EDS)*: recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. La energía de cada rayo X es característica de cada elemento, por lo tanto, se puede obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de la superficie. Por ello, esta técnica es conocida como Microanálisis por EDS.

7.2.4 Microscopía Electrónica de transmisión (TEM)

Un microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) utiliza un haz de electrones para visualizar objetos. Los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la luz visible lo que permite mostrar estructuras de dimensiones nanométricas. Esta técnica precisa del uso de muestras ultrafinas para que los electrones que atraviesan la muestra (trasmisión electrónica) puedan generar una imagen. Es recomendable no utilizar muestras de más de 100 nm de grosor, ya que cuanto mayor es el espesor menor calidad de imágenes se obtiene.

Para poder obtener una imagen es necesario que el cañón de electrones (filamento de W o LaB₆) produzca un haz de electrones. Posteriormente, los electrodos de aceleración

aumentan la energía del haz de electrones entre 50 y 400 keV, ya que cuanto mayor sea el voltaje del acelerador mayor podrá ser el espesor de la muestra a estudiar. El sistema de lentes condensadoras permite focalizar el haz sobre una zona de la muestra. Por lo tanto, es necesario hacer uso de dos a cuatro lentes magnéticas (condensadoras), con el fin de dirigir y focalizar el haz hacia la rejilla donde se encuentra la muestra. El diseño y propiedades de estas lentes normalmente determinan la resolución del microscopio. Por último, para conseguir un flujo ininterrumpido de electrones, el TEM debe operar a bajas presiones, al igual que el SEM, del orden de 10^{-4} a 10^{-8} kPa. Es necesario trabajar a estas presiones debido principalmente a dos motivos: (1) permitir una diferencia de voltaje entre el cátodo y la tierra sin que se produzca un arco voltaico. (2) reducir la frecuencia de las colisiones de los electrones con los átomos del aire (niveles despreciables) para evitar frenar los electrones y distorsionar la imagen obtenida. Finalmente, los electrones transmitidos se proyectan sobre una placa fotográfica o una cámara fotográfica (CCD) para formar una imagen aumentada de la muestra.

Cuando el haz de electrones llega a la muestra, parte de los electrones son transmitidos, otros son dispersados y otros dan lugar a interacciones que pueden producir distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios, rayos X, etc. Todas estas señales pueden ser empleadas para obtener información sobre la naturaleza de la muestra (morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc.). Este microscopio es capaz de proporcionar información sobre ultraestructura de células y tejidos de animales o vegetales, además de poder determinar composición, morfología, dimensiones, posición de microcristales o partículas, así como, cristalografía, posición de los planos cristalinos y estudio de los defectos cristalinos en materiales inorgánicos.

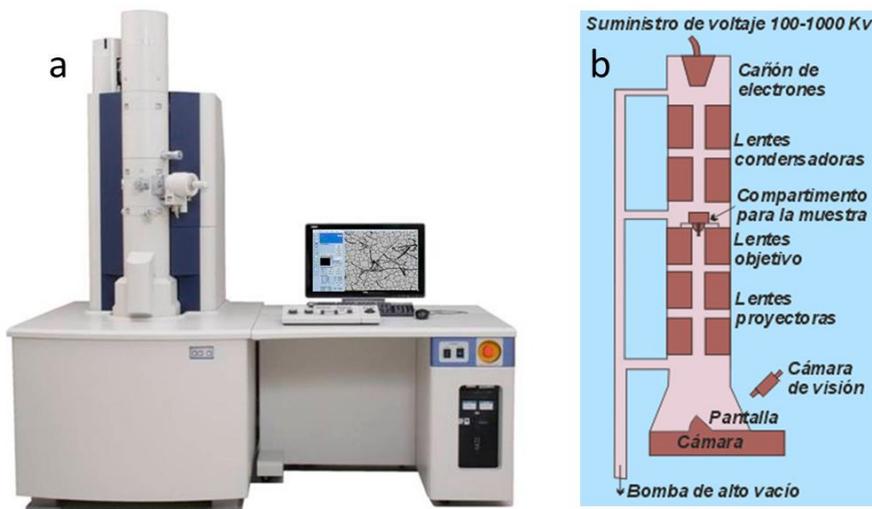


Figura 7.4. a) Fotografía de un microscopio electrónico de transmisión. b) Esquema de los principales componentes.

7.2.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La Microscopía de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*) es una técnica de barrido con sonda. El AFM se basa en la detección de interacciones de corto alcance (principalmente fuerzas de Van der Waals), entre la superficie de una muestra y una sonda (punta). Esta técnica proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real. Esta técnica caracteriza materiales a escala nanométrica y micrométrica, además de permitir detectar fuerzas del orden de nanonewtons. La magnitud de la interacción involucrada generalmente depende de la distancia. Por lo tanto, se puede establecer una relación directa entre la magnitud obtenida y la separación punta-muestra. Esto hace que el AFM sea utilizado en la caracterización de materiales para determinar sus propiedades físicas. Cuando se muestrea una superficie se registra su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica acoplada a un listón o palanca microscópica (*microcantilever*) muy flexible de entre 100-200 micras de largo. Desde su aparición, el AFM ha sido un equipo importante para la elucidación de las propiedades

microestructuras de materiales. El Microscopio de Fuerza Atómica es capaz de trabajar en diferentes modos para obtener la topografía de la superficie dependiendo de las características de la muestra. También puede determinar propiedades físicas de los materiales como: viscoelasticidad, fuerza eléctrica y fuerza magnética, o caracterizar las muestras desde un punto de vista morfológico proporcionando información sobre rugosidad, tamaño de grano o espesor.

El procedimiento de trabajo consiste en barrer de manera automática la superficie con la punta. Mediante un mecanismo de retroalimentación los scanners piezoeléctricos mantienen la punta interaccionando con la superficie a fuerza constante (de esta manera se obtiene información de alturas topográficas), o también pueden mantenerla a altura constante (para obtener información de fuerza) respecto de la superficie de la muestra. Las puntas de AFM son fabricadas mediante procesos de microfabricación pudiéndose obtener puntas con radios de curvatura de entre 1 y 10 nm. Normalmente, suelen ser de silicio o nitruro de silicio y se colocan hacia abajo desde el final del cantilever. La dimensión de la micropalanca (cantilever) varía entre 50 y varios centenares de micras. La longitud determina la dureza final, es decir, la constante de fuerza del cantilever (k o constante de la sonda). Por tanto, uno de los pasos previos más importantes es la elección de la punta más apropiada para cada tipo de experimento. Existen puntas fabricadas con recubrimientos finos de un material reflectante lo que permite un aumento de reflectividad (muy importante en medios donde la reflectividad disminuye, por ejemplo agua). Por lo tanto, dependiendo de la muestra a analizar se elegirá la sonda y longitud del cantilever que mejor se adapte a sus características. Las micropalancas pueden tener diferentes formas, por ejemplo, las triangulares se pueden utilizar para medidas de fricción y en medio líquido debido a su mayor estabilidad y las rectangulares se suelen utilizar para realizar experimentos al aire. En general, los

cabezales de AFM poseen un sistema de detección óptico donde incide el haz del láser reflejado por el cantilever.

En AFM existen tres formas de trabajo que dependen de la fuerza ejercida:

1. *Modo contacto*: Cuando la distancia entre la punta y la muestra se encuentra entre 10\AA y 100\AA y la fuerza interatómica entre el cantilever y la muestra es repulsiva, las fuerzas que surgen por este acercamiento provocan la curvatura del cantilever para tratar de acomodarse a los cambios de topografía.
2. *Modo no contacto*: Cuando la distancia entre la punta y la muestra es de entre 100\AA y 1000\AA y la fuerza interatómica entre el cantilever y la muestra es atractiva. Cuando se trabaja en el modo de no contacto (modo atractivo), no existe contacto físico entre la muestra y la punta, la fuerza entre ellas es muy baja, generalmente del orden de 10^{-12} N. Esta pequeña fuerza es beneficiosa para estudiar superficies suaves o elásticas.
3. *Modo de contacto intermitente o "Tapping"*: El modo "tapping" o contacto intermitente es la herramienta más avanzada en AFM. Este método tan potente permite una alta resolución en imágenes topográficas de superficies de muestras que pueden dañarse con facilidad. El modo "Tapping" está libre de problemas asociados a fricción, adhesión, fuerzas electrostáticas, etc.

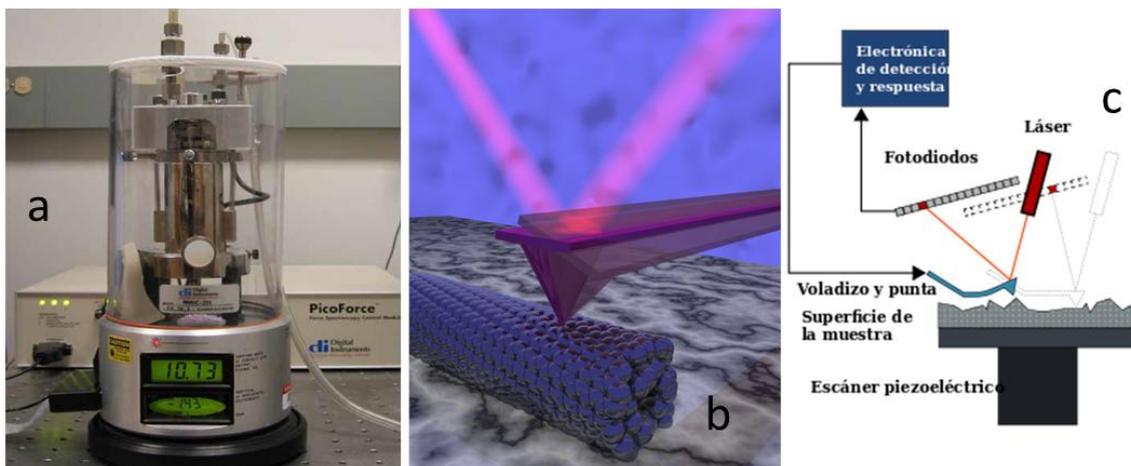


Figura 7.5 a) Fotografía de un microscopio de fuerza atómica. b) Representación del sistema de detección óptico que incide sobre la superficie del cantilever c) Esquema de los componentes principales.

7.2.6 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) consiste en irradiar la muestra con un haz de rayos X. Es una técnica de superficie semicuantitativa, altamente sensible que proporciona información sobre: 1) la estequiometría, 2) el estado químico superficial, 3) la estructura electrónica de elementos presentes en un material a concentraciones superiores al 0.1% atómico (excepción H y He) con un error aproximado del 10%, 4) la posición de los átomos con respecto a la estructura cristalina del material, 5) la homogeneidad superficial y 6) la presencia de adsorbatos.

La incidencia de un fotón de energía $h\nu$ sobre átomos situados en la superficie de una muestra provoca la emisión de fotoelectrones (**Figura 7.6**), por “*efecto fotoeléctrico*”, con una determinada energía de ligadura:

$$E_B = h\nu - E_K - W \quad \text{Ecuación 7.12}$$

donde $h\nu$ es la energía de los fotones, E_K la energía cinética del fotoelectrón producido, W la función de trabajo del espectrómetro y E_B la energía de ligadura.

La energía de ligadura es la energía mínima necesaria que hay que comunicar a un átomo para arrancar un electrón. Este parámetro identifica al electrón de forma específica en términos de elemento y nivel atómico.

El campo de aplicación de las técnicas de análisis de superficies está limitado a las capas más externas del sólido, es decir, espesores entre 1 y 10 monocapas (los primeros 10 nm o 100 Å). Esta capa con el tiempo no es estable ya que puede sufrir diversas reacciones físico-químicas con la atmósfera que la rodea. Es decir, una “superficie real” contendrá una capa normalmente contaminada de entre 5-10 nm de espesor. Los contaminantes más habituales suelen ser: óxidos, hidróxidos, carbonatos, dióxido de carbono, agua e hidrocarburos ligeros. Esta capa, relativamente estable a temperatura ambiente, constituye la “superficie práctica”. La mayoría de las técnicas de análisis de superficies son capaces de proporcionar información relativa a espesores mayores que una monocapa. Aunque la contribución de esta primera capa es siempre superior a la de las siguientes más profundas. Cuando se combinan los bombardeos de rayos X e iones Argón se puede decapar y exponer material no modificado hasta una profundidad de hasta un máximo de 1µm, lo que proporciona perfiles de composición. Para espesores superiores a 1 µm es posible utilizar métodos mecánicos como el desbastado o el pulido, lo que permite acceder a superficies no expuestas a la atmósfera donde la contribución de los adsorbatos se reduce significativamente.

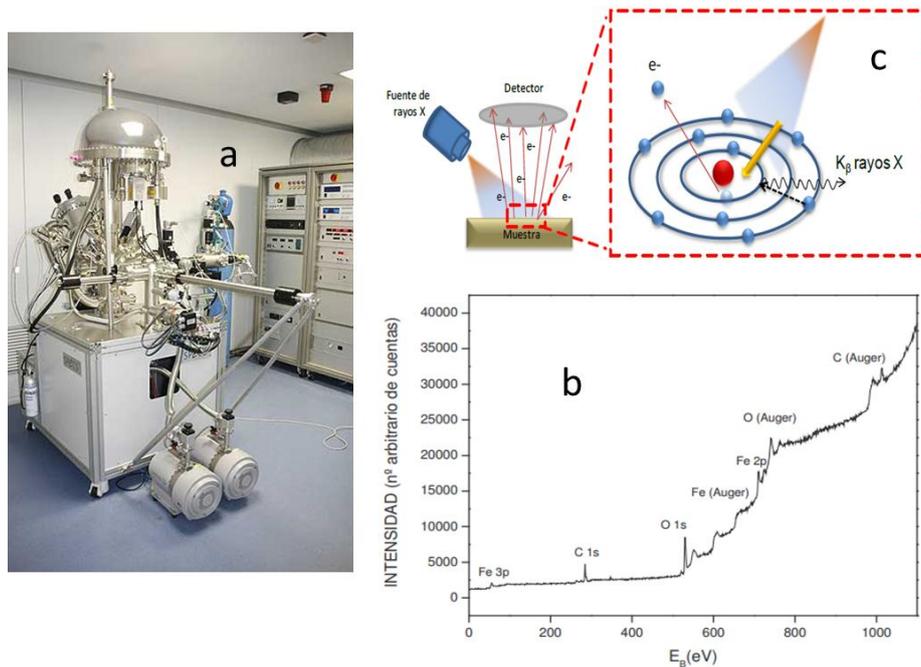


Figura 7.6. a) Espectrómetro de fotoemisión de rayos X (XPS). **b)** Espectro de XPS para un óxido de hierro **c)** Diagrama sobre los fundamentos de la técnica de XPS.

Los componentes principales de un XPS son: sistema de vacío, fuente de rayos X, analizador de energía del electrón, sistema de recogida y tratamiento de datos. La parte central del equipo lo constituye la cámara principal de vacío en la que la muestra es analizada.

Es necesario realizar los experimentos en condiciones de vacío debido a que:

1. Los fotoelectrones deben viajar desde la muestra hasta el detector sin colisionar
2. La fuente de rayos X requiere condiciones de vacío para mantener la operatividad
3. La composición superficial de la muestra debe permanecer invariable durante todo el experimento

Las fuentes de rayos X más empleadas poseen ánodos de Al o Mg, aunque también se pueden utilizar ánodos de Si, Zr, Ag, Ti, Cr. Por medio del uso de un cristal de cuarzo la radiación de rayos X es monocromatizada antes de llegar a la muestra, lo que permite

aprovechar el rango de energía, donde la intensidad de la radiación X es máxima (normalmente un ancho de 1-2 eV), evitando los picos satélites de fluorescencia de rayos X e impidiendo que electrones de alta energía provoquen golpes de calor a la muestra y la degraden.

El área de muestra que puede ser irradiada por los rayos X varía entre zonas circulares de unos pocos centímetros de diámetro hasta unas 50 micras. Esta focalización depende de la geometría de la fuente y del tipo de cañón de electrones utilizado para excitar la emisión de rayos X.

7.2.7 Difracción de Rayos X (XRD)

Cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un sólido ordenado regularmente se produce una difracción (**Figura 7.7a**) descrita por la Ley de Bragg. Los rayos X son difractados por los electrones que rodean los átomos debido a que la longitud de onda es del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El haz de rayos X emergente, después de la interacción, contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Gracias a su estructura periódica, los cristales dispersan elásticamente los haces de rayos X en ciertas direcciones y los amplifican por interferencia constructiva, originando un patrón de difracción (**Figura 7.7c**). La ley de Bragg permite estudiar las direcciones en las que la difracción de rayos X sobre la superficie de un cristal produce interferencias constructivas. Por lo tanto, se pueden predecir los ángulos en los que los rayos X son difractados por un material con estructura atómica periódica (materiales cristalinos).

La ley de Bragg viene dada por:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta \quad \text{Ecuación 7.13}$$

Donde λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, θ es el ángulo que forman el haz incidente y los planos cristalinos, n es un número entero y d_{hkl} es la distancia entre planos cristalinos (ver figura 7.7a).

Por otro lado, si la red cristalina está libre de deformación y los cristales son predominantes en la muestra, se puede estimar el tamaño cristalino de las partículas (β) empleando la fórmula de Scherrer:

$$\beta = \kappa \cdot \lambda / FWHM \cdot \cos \theta \quad \text{Ecuación 7.14}$$

donde **FWHM** es la anchura del pico máximo en el difractograma a mitad de altura, λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X (por ejemplo para línea CuK α $\rightarrow \lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), θ es el ángulo donde tiene lugar la difracción y κ es una constante que depende de la estructura cristalina del material analizado.

Para un cristal cúbico con constante de red a , la distancia d está dada por:

$$d = a / (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2} \quad \text{Ecuación 7.15}$$

donde h , k y l son los índices de Miller de los planos cristalográficos.

Finalmente, combinando las ecuaciones 7.13 y 7.15, se puede calcular la constante de red del material.

A partir de las medidas de las manchas de difracción se pueden determinar las dimensiones de la celda unitaria. Sin embargo, para la deducción del sistema cristalino es necesario determinar la simetría del patrón de difracción. Las ausencias sistemáticas de ciertos tipos de reflexiones evidencian la presencia de celdas unitarias no primitivas, de planos de deslizamiento y de ejes helicoidales lo que ayudará a deducir los grupos espaciales. Esta técnica permite identificar diferentes fases ya que cada sustancia

produce un diagrama de difracción característico independiente del estado en el que se encuentre (puro o formando parte de una mezcla). Este es el principio básico del análisis químico por métodos de difracción. Este análisis puede realizarse de manera cualitativa, identificando que sustancia o sustancias corresponden a los diagramas de difracción, o cuantitativamente, ya que las intensidades de las líneas de difracción de cada fase son proporcionales a la fracción en volumen de esa fase presente en la muestra.

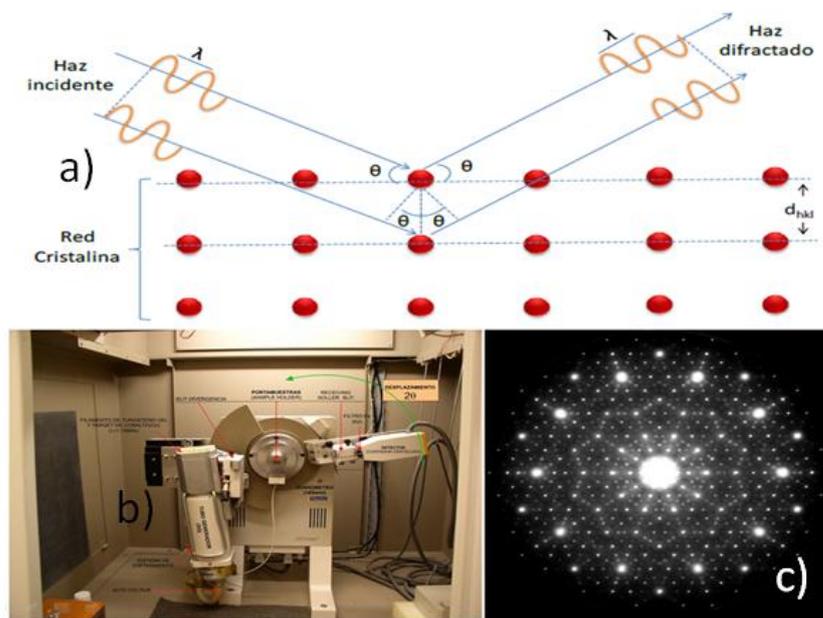


Figura 7.7 a) Esquema del proceso de difracción de un haz de rayos X sobre una red cristalina. **b)** Difractómetro de rayos X en modo de reflexión **c)** Diagrama de difracción obtenido para una especie cristalina.

Un difractómetro de rayos X está compuesto por: una fuente de energía que suele ser un ánodo giratorio que produce un haz de rayos X de una determinada longitud de onda, un monocromador que aísla el haz de rayos X producido, un colimador que alinea el haz de rayos X, un goniómetro giratorio que permite situar la muestra y variar los ángulos con respecto al haz y un detector encargado de grabar o recoger el patrón de difracción. En la **Figura 7.7b** se presenta un diagrama esquemático del difractómetro de rayos X operado en modo reflexión.

7.2.8 Espectroscopía Visible-Ultravioleta, Infrarroja y Raman

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Esta interacción provoca procesos como la absorción (IR, Vis-UV) o dispersión (Raman). Cuando una molécula absorbe o emite un fotón su estado energético se modifica para dar lugar, a cambios en la energía traslacional de la molécula, a transiciones electrónicas de la capa de valencia (Vis-UV) y a cambios en su estado energético vibracional o rotacional (IR, Raman). Cada uno de estos procesos se puede tratar de manera independiente debido a que las energías asociadas a cada uno de estos cambios son muy diferentes. Los estados energéticos de las moléculas están cuantizados, exceptuando los cambios traslacionales. Por lo tanto, los procesos de absorción y emisión sólo pueden darse a determinadas frecuencias de los fotones. Además, el conjunto de frecuencias a las que se producen estos procesos es propio de cada molécula, es decir, para una determinada molécula, su espectro de adsorción/emisión constituye una "huella" de la misma.

7.2.8.1 Espectroscopía Visible-Ultravioleta (Vis-UV)

La espectroscopía visible-ultravioleta es una espectroscopía de emisión de fotones que utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas en esta región del espectro provoca transiciones electrónicas de la capa de valencia que pueden ser cuantificadas. La región del espectro electromagnético que corresponde a las transiciones electrónicas de la capa de valencia se extiende en un rango de longitudes de onda desde 100 hasta 1000nm (regiones ultravioleta-visible e infrarroja cercana). La región por debajo de 200nm, conocida como ultravioleta lejano, presenta características que hacen complicada su utilización siendo necesario trabajar en

condiciones de vacío y usar celdas de LiF, CaF₂. La región entre 200 y 400nm, llamada ultravioleta cercano es de gran utilidad en la determinación estructural de insaturaciones conjugadas, de aromaticidad o de ciertos grupos insaturados con pares electrónicos libres como carbonilos o nitrilos. La región visible, de 400 hasta cerca de 800nm, es la única del espectro electromagnético detectable por el ojo humano. Las transiciones que se presentan en esta zona corresponden a transiciones electrónicas de muy baja energía. Todos los compuestos coloreados absorben selectivamente en esta región.

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumpla:

$$I_0 = I_a + I_t \quad \text{Ecuación 7.16}$$

La transmitancia (T) de una sustancia en disolución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 , normalmente se representa en tanto por ciento:

$$T(\%) = I_t/I_0 \times 100 \quad \text{Ecuación 7.17}$$

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la concentración del analito, puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por el mismo, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia:

$$A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0 \quad \text{Ecuación 7.18}$$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la T es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, lo que significa que A vale $\log 1 = 0$.

La utilidad de esta espectroscopía, desde un punto de vista analítico, consiste en comparar la radiación absorbida o transmitida por una disolución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Para obtener esta relación se emplea la *ley de Lambert-Beer* que expresa la relación entre la absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y la concentración de un cromóforo en disolución:

$$A = \log I_t/I_0 = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ecuación 7.19}$$

donde **A** es la absorbancia medida, **I₀** es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, **I** es la intensidad de transmisión, **L** la longitud de ruta a través de la muestra, y **c** la concentración de las especies absorbentes.

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración (**c**), es decir, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución (**l**), a igual concentración cuanto mayor sea la distancia recorrida por la luz mayor número de moléculas se encontrará; por último, depende de ε , es una constante conocida como *absortividad molar* o *coeficiente de extinción*. Esta constante es específica para cada cromóforo.

7.2.8.2 Espectroscopía Infrarroja (IR)

La espectroscopía IR se fundamenta en la absorción de la radiación IR por parte de las moléculas, dicha absorción hace que pase a un estado energético (rotacional y/o vibracional) excitado. Las absorciones que se producen en la región espectral del infrarrojo involucran energías mucho más pequeñas si las comparamos con las energías de absorción relacionadas con la estructura electrónica de la molécula (ultravioleta y visible). Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando la energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición

vibracional/rotacional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar/rotar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. Una molécula de N átomos tiene $3N$ grados de libertad: 3 de traslación, 3 de rotación (2 si es lineal) y $3N-6$ de vibración ($3N-5$ si es lineal). Los movimientos de vibración de una molécula se pueden descomponer en oscilaciones en las que los átomos se mueven en fase, se denominan *modos normales de vibración*, cada uno de los cuales tiene una frecuencia característica. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: (1) de tensión y (2) de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La frecuencia o longitud de onda de cada modo de absorción es función de: la masa relativa de los átomos, la constante de fuerza de los enlaces y la geometría de la vibración. Esto hace posible asignar frecuencias características de alargamiento y flexión a grupos funcionales específicos. La porción infrarroja (IR) del espectro electromagnético generalmente se divide en tres regiones; infrarrojo cercano, medio y lejano, por su relación con el espectro visible. En el IR cercano, aproximadamente $14000-4000\text{ cm}^{-1}$, la radiación puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas. El infrarrojo medio, aproximadamente $4000-400\text{ cm}^{-1}$, puede ser utilizado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura de rotación-vibración asociada. El infrarrojo lejano, de aproximadamente 400 a 10 cm^{-1} , situado contiguo a la región de las microondas, presenta bajo consumo de energía y puede ser utilizado para la espectroscopía de rotación.

7.2.8.2.1 Bandas activas en infrarrojo

No todos los modos normales de una molécula necesariamente aparecen en el espectro como picos de absorción, siendo determinante para la selección de los mismos la simetría de la molécula. *El requerimiento general para absorber radiación infrarroja es que la vibración debe producir un cambio neto en el momento dipolar de la molécula.* En moléculas altamente simétricas es frecuente que pares o triadas de modos sean idénticos. Estos casos se llaman modos de vibración degenerados y dan lugar a una sola banda. Según la regla de exclusión, si una molécula tiene centro de inversión, ninguno de sus modos normales puede ser activo a la vez en IR y Raman, pudiendo ser un modo inactivo en ambos. Por otro lado, las vibraciones que tienen frecuencias muy cercanas suelen aparecer como una sola banda.

7.2.8.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de gran variedad de materiales lo que hace posible su identificación. Se basa en los fenómenos de dispersión inelástica de la luz monocromática al incidir sobre un material. La luz dispersada inelásticamente experimenta ligeros cambios de frecuencia característicos del material analizado e independiente de la frecuencia del haz incidente. Este fenómeno tiene su origen en la interacción de la radiación electromagnética con una nube electrónica deformable (*molécula polarizable*). Para que una vibración sea activa en Raman la polarizabilidad de la molécula debe cambiar con el movimiento vibracional.

Se trata de una técnica de análisis donde la muestra a analizar no necesita ningún tipo de preparación especial y además, no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es una técnica no destructiva.

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$, considerablemente mayor que la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) chocan con una molécula, la mayor parte atraviesan la muestra, pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes). Desde el punto de vista físico, los fotones incidentes llevan a la molécula transitoriamente a un nivel de energía superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón. Según la energía del fotón emitido podemos tener:

Dispersión Rayleigh: el fotón es dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente (choque elástico), la molécula vuelve al mismo nivel energético y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente.

Dispersión Raman Stokes: el fotón dispersado tiene una frecuencia menor ($\nu_0 - \nu_r$) a la del incidente (ν_0), y la molécula vuelve a un estado energético permitido pero mayor al que tenía inicialmente.

Dispersión Raman anti-Stokes: el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor ($\nu_0 + \nu_r$) a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula, inicialmente no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado.

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía. Por lo tanto, la probabilidad de que puedan ocurrir transferencias de energías que den lugar a dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de dispersión Raman anti-Stokes. Es decir, la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a

la dispersión Raman anti-Stokes. Esta diferencia de intensidad es el motivo por el que habitualmente se utiliza el efecto Stokes.

Puesto que el desplazamiento de las frecuencias Raman es independiente de la frecuencia incidente se suele tomar como abscisa para representar los espectros Raman este desplazamiento, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, en el eje de ordenada se representa el número de fotones captados y en el eje de abscisas se representa la diferencia entre la frecuencia Raman y la excitación del láser.

7.2.8.4 Espectroscopía Raman vs IR

Aunque las espectroscopías IR y Raman den lugar al mismo tipo de transiciones entre estados vibracionales, están gobernadas por mecanismos de interacción diferentes: IR (absorción), Raman (dispersión inelástica de luz). En IR se usa una fuente policromática, mientras que en Raman se usa un láser monocromático. A su vez, en los modos vibracionales simétricos no hay cambio en el momento dipolar (siendo dichos modos inactivos en IR) mientras que la polarizabilidad sí fluctúa (activos en Raman). Finalmente, en las moléculas que presentan estados vibracionales asimétricos cambia el momento dipolar (activos en IR) pero la polarizabilidad no cambia (siendo inactivo en Raman). Por otro lado, Raman tiene la ventaja de no necesitar ninguna etapa de preparación de muestra, pero tiene el inconveniente de que son muy débiles muchas de las bandas de absorción del agua.

7.2.9 Análisis térmico

El análisis térmico abarca un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura mientras se le somete a un programa de temperatura controlado. Se pueden distinguir varios métodos térmicos los cuales difieren en las propiedades medidas y en los programas de

temperatura utilizados. Los efectos del calor en los materiales pueden ser diversos y generar cambios en muchas de sus propiedades. La atmósfera a la cual se produce el calentamiento puede ser estática o dinámica (caudal determinado), también pueden ser empleadas condiciones de presión reducida, donde los gases más utilizados habitualmente suelen ser N₂, aire, Ar, CO₂

En las técnicas de análisis térmico los cambios de peso configuran la base de la termogravimetría (TG), mientras que la medida de los cambios de energía constituye la base del análisis térmico diferencial (TDA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Así, la termogravimetría es capaz de proporcionar información sobre cuándo y cuánto una muestra gana o pierde peso, mientras que el TDA y el DSC nos indica si una reacción o cambio físico es endotérmico o exotérmico y a menudo es capaz de medir la variación de calor.

7.2.9.1 TG

En un análisis termogravimétrico se registra de manera continuada la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, bien en función de la temperatura o en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico), la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación gráfica de la masa o el porcentaje de masa en función del tiempo ó de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica.

Una característica fundamental de la TG es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso, tales como, descomposiciones, sublimaciones,

reducción, desorción, absorción, etc., mientras que no permite estudiar procesos como fusiones, transiciones de fase, etc.

7.2.9.2 TDA

La técnica de TDA mide la diferencia de temperatura entre una muestra y un material de referencia ambos sometidos al mismo proceso de calentamiento. En el caso de que ocurra un proceso endotérmico (ΔH positivo, ej. fusión de un metal), la temperatura de la muestra, T_s , sufrirá un retraso respecto a la de la referencia, T_r , mientras continua el programa de calentamiento. Si ocurre un proceso exotérmico en la muestra (ΔH negativo, ej. oxidación), la respuesta será en sentido contrario.

7.2.9.3 DSC

La finalidad de la calorimetría diferencial de barrido es registrar la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. La muestra y la referencia se alojan en dos pocillos idénticos que se calientan mediante resistencias independientes. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica bien sea a la muestra o a la referencia, con la finalidad de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

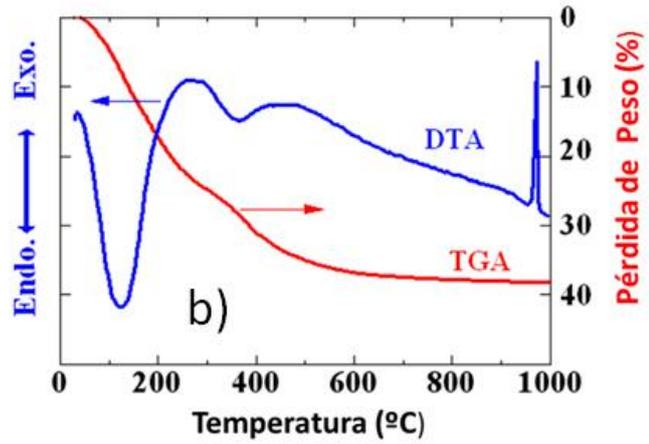
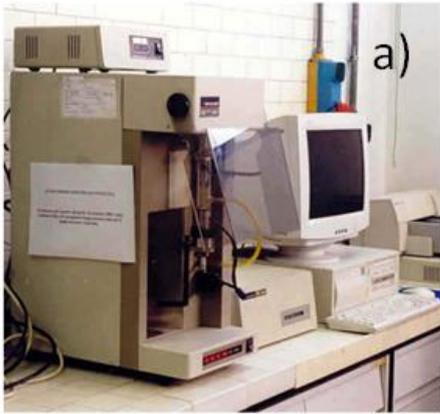


Figura 7.8 a) Analizador termogravimétrico. **b)** Gráficos de TG y TDA.

7.2.9.4 TDA vs DSC

La DSC es una técnica similar al TDA y suministra una información semejante. La diferencia entre el TDA y el DSC consiste en que el DSC en lugar de medir una diferencia de temperaturas entre la muestra y una referencia (sustancia que no sufre ninguna transición o transformación en el intervalo de temperaturas en el que se mida), mide la energía que es necesaria suministrar a la muestra para mantenerla a idéntica temperatura que la referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Preparación de nanopartículas magnéticas en configuración *core-shell* de magnetita (Fe₃O₄) modificadas con polidopamina para la construcción de biosensores

La estrategia empleada en la preparación de las nanopartículas magnéticas y su posterior funcionalización con polidopamina e inmovilización con enzima peroxidasa de rábano (HRP) vienen descritas en el **artículo 1**(ver apéndice):

Preparation of core-shell Fe₃O₄@poly(dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor construction; J. Mater. Chem. B, 2014, 2, 739.

La síntesis de las NPMs se realizó mediante el método de co-precipitación química a partir de una disolución de Fe²⁺/Fe³⁺ en medio alcalino. Posteriormente las NPMs se recubrieron con polidopamina (NPMs@pDA) mediante la polimerización de DA en disolución acuosa de tampón fosfato (PBS, pH: 8.5), durante aproximadamente 3 horas. Los datos obtenidos mediante HR-TEM demostraron que las NPMs poseían una estructura cuasi-esférica con un tamaño de 11 ± 3 nm y una distancia interplanar de 0.480 nm correspondiente al plano cristalográfico (111) de la magnetita Fe₃O₄. Un análisis más detallado permitió estimar el espesor de la capa polimérica en 1.8 ± 0.2 nm. Las medidas de XRD de las NPMs@pDA mostraron patrones de difracción típicos para la magnetita. El tamaño cristalino se determinó por la ecuación de Debye-Scherrer (para la línea de difracción (331)) obteniéndose un valor de 10nm, muy similar a resultado obtenido previamente mediante HR-TEM. La similitud de los patrones de difracción de las NPMs y NPMs@pDA sugieren que el recubrimiento polimérico no afecta a la estructura cristalina del material.

Mediante la técnica FE-SEM se realizó un análisis morfológico, a menor resolución, de las nanopartículas recubiertas con polímero. En este análisis se observó que las

NPMs@pDA presentaban un elevado estado de agregación resultado probablemente de la gran acumulación de cargas negativas en la superficie y de la adsorción de nanopartículas NPMs @pDA y/o reacciones de auto-polimerización cruzadas entre las distintas superficies de las nanopartículas.

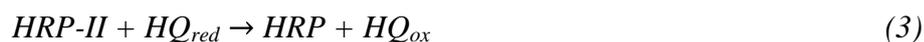
El análisis térmico mostró un pico exotérmico a 300 °C y una pérdida de peso de aproximadamente un 14% atribuida a la descomposición térmica del polímero. Estos datos confirman la modificación de la superficie de las nanopartículas con pDA.

La inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) sobre la superficie de las nanopartículas magnéticas (NPMs @pDA) se realizó dispersando las nanopartículas (25mg mL^{-1}) en una disolución de HRP en tampón fosfato de concentración 1 mg mL^{-1} durante 3 h y bajo agitación. En estas condiciones, los grupos quinona presentes en la superficie de las nanopartículas favorecen la inmovilización covalente de la enzima a través de la formación de enlaces tipo base de Schiff y/o adiciones tipo Michael.

Mediante espectroscopía UV-Vis y FT-IR se estudió en detalle el proceso de inmovilización. Estas técnicas corroboraron la correcta inmovilización enzimática de las nanopartículas magnéticas, estimándose la cantidad de enzima inmovilizada en $18\text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$. También se concluyó que una vez se realizaba la inmovilización enzimática (NPMs@pDA/HRP) la actividad del HRP se reducía ligeramente ($\sim 10\%$), lo que indica que la estructura tridimensional de la enzima no se modifica sustancialmente durante el proceso de inmovilización ya que retiene un 90% de la actividad catalítica.

El potencial uso analítico de las nanopartículas se demostró mediante el desarrollo de un biosensor electroquímico amperométrico para la detección H_2O_2 . Para ello, se funcionalizó un electrodo de carbón vitrificado (GCE) con las nanopartículas sintetizadas. Se utilizó la hidroquinona como mediador enzimático (HQ), actuando

como transportador de electrones desde la enzima hasta la superficie del electrodo de acuerdo con el siguiente mecanismo:



donde HRP, HRP-I y HRP-II representan la enzima peroxidasa en la forma nativa y en las dos formas oxidadas, respectivamente; y HQ_{red} y HQ_{ox} son HQ en su forma reducida y oxidada, respectivamente.

Se utilizó la voltametría cíclica (CV) para evaluar la respuesta del biosensor frente a la HQ. En el estudio se adquirieron datos del voltamperograma, intensidad de corriente de pico, dependencia con la velocidad de barrido, potenciales de pico anódico y catódico, etc. El análisis de los datos reveló que la respuesta del biosensor estaba controlada por un proceso difusivo y que en presencia de H_2O_2 seguía el mecanismo indicado anteriormente, donde se produce de manera paralela un incremento en el pico catódico y una disminución en el pico anódico, como consecuencia de la generación enzimática de HQ en estado oxidado. Se realizaron experimentos análogos con la configuración GCE/MNPs@pDA demostrándose que la respuesta obtenida era debida a la actividad enzimática y no a cualquier otro mecanismo catalítico que pudiera ocurrir en la superficie del sensor electroquímico.

Con la finalidad de lograr la máxima sensibilidad del biosensor amperométrico desarrollado se optimizaron las variables experimentales que se consideraron más

importantes como la temperatura, cantidad de nanopartículas depositadas sobre la superficie del GCE, potencial de detección, concentración de HQ y pH. En la **tabla 8.1.1** se muestran los resultados de los estudios optimización y las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos analíticos realizados.

Tabla 8.1.1 Optimización de parámetros experimentales y condiciones de trabajo.

| | T (°C) | [HQ] (mM) | E (mV) | pH | MNP@pDA/HRP (µg) |
|-------------------------------|------------------|-----------|--------|-----|------------------|
| Condiciones óptimas | 55 | 1.2 | -150 | 7.4 | 50 |
| Condiciones de trabajo | t _{amb} | 1.2 | -150 | 7.4 | 50 |

Los experimentos de cronoamperometría permitieron calcular la constante catalítica (k_{cat}) de la enzima retenida en la superficie de las nanopartículas, así como, la constante de difusión para el H₂O₂ ($D_{H_2O_2}$), siendo los valores obtenidos $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $2.3 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente y consistentes con los valores recogidos en la bibliografía.

Para demostrar las ventajas del empleo de un sistema nanoestructurado se comparó la respuesta analítica de dos configuraciones muy diferentes. En una de ellas, la enzima se adsorbió directamente sobre el GC (GCE/HRP) y en la otra, se utilizó una configuración nanoestructurada, con la enzima inmovilizada covalentemente sobre las NPMs@pDA (GCE/MPNPs@pDA/HRP). La **tabla 8.1.2** recoge los resultados experimentales obtenidos para ambas configuraciones. Los datos muestran una evidente mejora cuando se emplea la configuración nanoestructurada. Por otro lado, el valor de la constante de Michaelis para la configuración nanoestructurada (3.05 mM) fue menor que los valores encontrados por otros autores respecto al valor en estado nativo, lo que pone de manifiesto los excelentes resultados obtenidos en el proceso de inmovilización y una mayor afinidad por el sustrato enzimático (H₂O₂).

Tabla 8.1.2 Comparación de los parámetros analíticos y enzimáticos para distintas configuraciones.

| | Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Límite de detección (nM) | Rango lineal (μM) | Tiempo de respuesta (s) | V_{max} (μA) | K_M (mM) |
|------------------------------------|---|--|---------------------------------------|---|--------------------------------|------------------------------|
| GCE/HRP | 100.25 (R ² =0.972) | 798 | 0.6-800 | - | 10.11 | - |
| GCE/NPMs @pDA/HRP | 442.14 (R ² =0.999) | 182 | 0.6-800 | <10 | 88.23 | 3.05 |

También se realizaron estudios de la respuesta del biosensor frente algunos interferentes potenciales tales como glucosa, lactato, L-glutamato, colina, ácido úrico (AU) y ácido ascórbico (AA). El grado de interferencia se evaluó comparando la respuesta amperométrica obtenida para una concentración de 1 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de cada uno de los interferentes a una concentración de 0.1 mM. Sólo el AU y el AA mostraron una respuesta positiva.

El estudio de la estabilidad temporal de las nanopartículas (NPMs@pDA/HRP) durante un período de 28 días, conservadas en PBS (pH 7.4) a 4 °C, no mostró degradación significativa de la enzima en la superficie de las NPMs. Finalmente, la reproducibilidad obtenida con diferentes biosensores fue del 3.9%, valor aceptable para fines analíticos.

8.2 Preparación de nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina enriquecida con grupos quinona: aplicación en biosensores.

La estrategia empleada para preparar las nanopartículas magnéticas y su posterior funcionalización con polidopamina e inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (Gox) vienen descritas en el **artículo 2** (ver apéndice):

Quinone-Rich Poly(dopamine) Magnetic Nanoparticles for Biosensor Applications; ChemPhysChem, 2014, 15,3742.

La síntesis de NPMs se realizó mediante el método de coprecipitación química a partir de una disolución de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en medio alcalino y, posterior polimerización de DA en disolución acuosa de tampón fosfato (pH: 8.5) durante aproximadamente 3 horas. Una vez obtenidas las nanopartículas fueron sometidas a un proceso de oxidación térmica (150 °C) durante 1 hora. Este proceso provocó la oxidación de los restos catecoles presentes en la superficie del polímero y un enriquecimiento superficial de grupos reactivos (quinonas).

Las medidas de XRD para las NPMs@pDA mostraron patrones de difracción típicos para la magnetita. La presencia de picos muy anchos indicó la naturaleza ultrafina y pequeño tamaño cristalino de la muestra. El tamaño cristalino fue determinado por la ecuación de Debye-Scherrer (para la línea de difracción (331)) obteniéndose un valor de 17.2 nm. Los valores de parámetro de red (a) y distancia interplanar (d_{hkl}), obtenidos mediante la ley de Bragg, fueron 8.400 y 2.529 Å, respectivamente. Estos valores están muy cercanos a los valores encontrados para la magnetita pura en la bibliografía (8.394 y 2.531 Å, respectivamente).

La estructura (*core-shell*) y la composición de las nanopartículas fueron analizadas mediante XPS. Se pudo confirmar mediante el espectro de XPS que las nanopartículas

modificadas (NPMs@PDA) la presencia de magnetita debido a la forma y posición de los picos de emisión característicos $\text{Fe}2p_{3/2}$ y $\text{Fe}2p_{1/2}$. Del mismo modo, los picos C1s y N1s a 284.6 y 398.9 eV, respectivamente, corroboraron la polimerización de pDA en la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, el tratamiento térmico produjo un desplazamiento de la posición de las bandas $\text{Fe}2p_{3/2}$ y $\text{Fe}2p_{1/2}$ hacia zonas menos energéticas, ~ 1 eV, confirmando una cierta la transición de fase de magnetita (Fe_3O_4) a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en la superficie del material debido a la oxidación térmica. Los espectros de alta resolución para O1s de NPMs@pDA y NPMs@pDA150 mostraron un desplazamiento análogo al descrito anteriormente. Este comportamiento está justificado en la bibliografía como el resultado de una mayor contribución de los grupos quinona (C=O, 531,4 eV) respecto a los grupos catecoles (C-OH, 533,0 eV) después de la oxidación térmica. La deconvolución de los espectros de alta resolución confirmó la existencia de un mayor número de grupos quinona, siendo la relación quinona/catecol aproximadamente de un 60 %. Este valor representa el doble del valor encontrado por Luo et al. para el polímero sin modificar y además, se encuentra próximo a los resultados obtenidos por estos autores tras realizar la oxidación térmica del film (50 %). Las imágenes obtenidas por AFM permitieron estudiar la estructura y reactividad de las diferentes configuraciones de las nanopartículas. Así, la **Tabla 8.2.1** muestra los tamaños medios y desviaciones estándar para cada una de las distintas nanopartículas. Este estudio proporcionó información sobre las nanopartículas sintetizadas estableciéndose el tamaño en ~ 15 nm y el espesor del polímero en ~ 2 nm, siendo estos resultados análogos a los obtenidos en trabajos anteriores. Las imágenes obtenidas mostraron una mayor densidad de nanopartículas en la superficie del superficie de grafito empleada como soporte en las configuraciones que poseían recubrimiento polimérico. Dicho resultado se justificó debido a la mayor reactividad química de las

NPMs@pDA. También se observó un notable incremento en la cantidad de material retenido cuando se realizó una oxidación térmica, debido al aumento de la concentración superficial de grupos quinona.

Los resultados ponen de manifiesto que la modificación propuesta (recubrimiento polimérico y oxidación térmica) presenta una gran reactividad y capacidad para aumentar la inmovilización de material biológico en etapas posteriores.

Tabla 8.2.1. Resultados de distribución de tamaños obtenidos mediante AFM

| Table S1. Particle size range and average exhibited by MNPs. | | | |
|---|--------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Size [nm] | | |
| | Fe ₃ O ₄ | Fe ₃ O ₄ @PDA | Fe ₃ O ₄ @PDA 150 |
| Range | 11-21 | 13-24 | 13-23 |
| Average | 15.4±2.3 | 17.8±2.2 | 17.4±2.6 |

Las NPMs modificadas fueron estudiadas mediante espectroscopía Vis/UV e IR, obteniéndose resultados análogos a los descritos anteriormente. La cantidad de enzima inmovilizada en la superficie de las NPMs se calculó a partir de la diferencia del valor de la absorbancia antes y después de introducir en la disolución enzimática una cantidad conocida de NPMs. De esta forma, se estimó que la cantidad de enzima inmovilizada aproximadamente en 21, 32 y 55 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de nanopartículas para las configuraciones MNPs/Gox, MNPs@PDA/Gox y MNPs@pDA150/Gox, respectivamente.

Las nanopartículas fueron transferidas a la superficie de un electrodo serigrafado (DRP-700) modificado con azul de Prusia (PB) para poder estudiar las posibles aplicaciones analíticas. Para ello, se utilizó un imán de neodimio en la parte inferior del electrodo de trabajo. El peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática fue detectado a

-150 mV y se utilizó para cuantificar la cantidad de glucosa en disolución.

Los principales factores (temperatura, pH, cantidad de nanopartículas, potencial de detección) que podían afectar a la respuesta del biosensor fueron estudiados en detalle y

optimizados. Posteriormente, se realizó un estudio de sensibilidad analítica donde se compararon las distintas configuraciones de nanopartículas desarrolladas con la configuración básica, donde la enzima es retenida directamente sobre la superficie del electrodo serigrafado. Nuevamente, los mejores resultados se obtuvieron para la configuración MNPs@pDA150/Gox (ver **Tabla.8.2.2**). Esta configuración muestra un aumento en la sensibilidad y una disminución en el límite de detección en comparación con el resto de configuraciones. Por otro lado, los valores de K_M encontrados para las configuraciones nanoestructuradas fueron menores que para las configuraciones sin nanoestructurar, lo que indica una mayor afinidad del sustrato hacia estas superficies.

Tabla 8.2.2. Resultados obtenidos para distintas configuraciones empleadas en el diseño de un biosensor de glucosa

| Table 1. Enzyme kinetic and analytical parameters of different glucose biosensor designs. Sensitivity was obtained in the range of 0–1 mM, mean \pm SD ($n=4$ biosensors). The limit of detection and limit of quantification were calculated as $3\times$ SD and $10\times$ SD of the background current, respectively. Calibration curves were obtained by applying -0.15 V against the pseudoreference electrode in air-saturated PBS (pH 7.4) | | | | | | |
|--|--|-------|-------------|-------------|---------------|-------------------------|
| Biosensor ^[a] | Sensitivity [mA M ⁻¹ .cm ⁻²] | r^2 | LOD [mM] | LOQ [mM] | K_M [mM] | V_{max} [μ A] |
| 1 | 8.74 \pm 0.35 | 0.998 | 0.020 | 0.067 | 1.713 | 2.787 |
| 2 | 5.54 \pm 0.17 | 0.997 | 0.064 | 0.212 | 1.752 | 1.757 |
| 3 | 2.38 \pm 0.41 | 0.998 | 0.149 | 0.496 | 1.741 | 1.172 |
| 4 | 0.91 \pm 0.16 | 0.996 | 0.282 | 0.942 | 2.773 | 0.426 |

[a] Biosensors denoted as 1: DPR-700/Fe₃O₄@pDA150/Gox, 2: DPR-700/Fe₃O₄@pDA/Gox, 3: DPR-700/Fe₃O₄/Gox, and 4: DPR-700/Gox.

En muestras biológicas existen agentes reductores que pueden ser electroquímicamente oxidados y por tanto, interferir en la detección de glucosa. Por este motivo fue necesario estudiar la respuesta del biosensor frente a interferentes fisiológicos, tales como, ácido ascórbico (AA) y ácido úrico (UA). Para realizar el estudio fue necesario preparar varias disoluciones de glucosa 5 mM en ausencia y en presencia de interferentes. Los valores de concentraciones de glucosa e interferentes utilizados en el estudio fueron escogidos de acuerdo a los valores de concentración que suelen presentarse en muestras

sanguíneas. Las concentraciones utilizadas fueron AA (100 mM), UA (300 mM), y ambos (AA + UA). Posteriormente, las disoluciones de trabajo fueron diluidas en PBS (1:10) para obtener una concentración de glucosa en el rango lineal del biosensor. Los resultados obtenidos mostraron únicamente pequeñas desviaciones (1-3 %) encontrándose dentro del rango de incertidumbre aceptado (ver a continuación).

Por otro lado, se realizaron estudios de reproducibilidad y repetitividad del biosensor optimizado (DPR-700/MNPs@pDA150/Gox). Los valores de desviación estándar relativa (RSD) para una serie de cinco mediciones sucesivas fue de 4,63% (repetibilidad), y para cinco biosensores construidos independientemente fue 7,37% (reproducibilidad).

Finalmente, la utilidad analítica de las nanopartículas fue comprobada midiendo la concentración de glucosa en sangre. Inicialmente, las muestras sanguíneas fueron diluidas en PBS (1:10). Posteriormente, se colocó una gota de la muestra sobre la superficie de la tarjeta serigrafiada (recubriendo adecuadamente los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar). Los resultados (**Tabla.8.2.3**) mostraron valores muy próximos a los valores obtenidos utilizando un glucómetro comercial (OneTouch), validando así los resultados obtenidos y la fiabilidad del biosensor desarrollado.

Tabla 8.2.3. Resultados y comparación con un glucómetro comercial de los resultados obtenidos al cuantificar la concentración de glucosa en sangre

| Table 2. Determination and comparison of glucose in blood samples against a commercial glucometer. | | | |
|--|-----------|--------------------------|--------------|
| Volunteer | One Touch | Biosensor ^[a] | Recovery [%] |
| 1 | 4.83 | 4.68 | 96.89 |
| 2 | 4.93 | 4.75 | 96.35 |
| 3 | 5.12 | 5.11 | 99.80 |
| 4 | 6.12 | 6.20 | 101.31 |
| 5 | 6.15 | 5.93 | 96.42 |
| 6 | 6.86 | 7.02 | 102.33 |

[a] DPR-700/Fe₃O₄@pDA150/Gox (1).

8.3 Desarrollo de una magneto-inmuno-plataforma basada en nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina para la detección de *Legionella pneumophila*.

La estrategia empleada tanto para preparar las nanopartículas magnéticas, como para su posterior funcionalización con polidopamina, inmovilización de anticuerpo y método de detección de *Legionella pneumophila* vienen descritas en el **artículo 3** (ver apéndice):

Rapid Legionella pneumophila determination based on a disposable core-shell Fe₃O₄@poly(dopamine) magnetic nanoparticles immunoplatform.

La síntesis de NPMs@pDA fue realizada por el método de coprecipitación química modificándose a posteriori con polidopamina durante 6 horas. Posteriormente, las nanopartículas modificadas fueron lavadas con agua para eliminar restos de monómero sin polimerizar y/o adsorbidos en la superficie del material. Finalmente, las NPMs@pDA fueron dispersadas en agua a una concentración de 25 mg mL⁻¹ y almacenadas en nevera a 4 °C.

La cepa de *Legionella pneumophila* SG1 fue obtenida de la Colección de Cultivos Tipo de Valencia y cultivada en las instalaciones de Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias, acorde a los requerimientos específicos para esta bacteria. El resto de bacterias (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas* y *Salmonella*) empleadas en el estudio fueron obtenidas a partir de muestras hospitalarias pertenecientes a la misma unidad de Medicina Preventiva. Para el manejo y preparación de disoluciones de bacteria se tomaron todas las precauciones (campana de flujo laminar, gafas, guantes, mascarillas, etc.) necesarias acorde al nivel de seguridad recomendado. A su vez, el área y material

de trabajo utilizados fueron limpiados con una disolución de hipoclorito o fenol al 5% cada día, autoclavados y/o eliminados según las normas de bioseguridad hospitalaria.

La disolución de *Legionella* se preparó en PBS a una concentración aproximada a 1McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ CFU mL⁻¹). A partir de la disolución de *Legionella* y mediante posteriores diluciones en PBS se obtuvieron las concentraciones deseadas.

Caracterización físico-química de las nanopartículas

Las nanopartículas modificadas presentaron estructura tipo *core-shell* con un tamaño de 12.5 ± 0.9 nm y un espesor de película de pDA de 4.0 ± 0.6 nm. El aumento de tamaño de la película se atribuye al incremento en el tiempo de polimerización durante el recubrimiento polimérico.

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas fueron examinadas mediante magnetometría (SQUID) en la Universidad Complutense de Madrid. Los resultados mostraron que ambas partículas (NPMs y NPMs@pDA) eran superparamagnéticas sin existencia de un ciclo de histéresis definido. A su vez, se observó una disminución de la Magnetización de Saturación (M_s), pasando de 57.8 a 28.9 emu/g, debido probablemente al aumento de masa atribuible a la presencia del recubrimiento polimérico.

Los estudios termogravimétricos corroboraron la existencia de una mayor cantidad de polímero en la superficie de las nanopartículas ensayadas en comparación con trabajos anteriores (18%, *J. Mat. Chem. B*), estimándose una pérdida total de peso al final del proceso térmico de un 24 %.

Nuevamente, los resultados obtenidos mediante XPS demostraron la composición de fase (Fe^{2+}/Fe^{3+}) de las nanopartículas de magnetita, así como, la correcta polimerización de pDA en la superficie. El uso de otras técnicas, espectroscopía infrarroja y Raman, también corroboraron la composición y modificación polimérica de las nanopartículas.

La técnica de Raman mostró picos característicos (A_{1g} , T_{2g} , E_g , T_{2g}) de la magnetita reafirmando la composición de fase de las mismas. A su vez, la presencia de una banda ancha en torno a 1400 cm^{-1} (estiramiento y deformación de los enlaces de los grupos catecoles) ratificó la presencia de polímero en la superficie.

Inmunoensayo electroquímico para la detección de *Legionella*

El protocolo de medida se inició colocando $5\ \mu\text{L}$ de NPMs@pDA en un eppendorf de $1.5\ \text{mL}$. Seguidamente, las NPMs@pDA fueron lavadas con H_2O y decantadas magnéticamente varias veces. Posteriormente, se realizó la inmovilización del anticuerpo primario. Para ello, se introdujo $100\ \mu\text{L}$ de PBS con anticuerpo primario (Ab) a una concentración de $25\ \mu\text{g mL}^{-1}$ y se dejó reaccionar durante 45 minutos a $37\ ^\circ\text{C}$ bajo agitación continua ($700\ \text{rpm}$). Una vez transcurrido el tiempo de inmovilización las NPMs@pDA-Ab fueron lavadas varias veces con PBS-Tween (PBST), con el fin de eliminar el anticuerpo adsorbido y no inmovilizado covalentemente a la superficie polimérica. Consecutivamente, se bloquearon los sitios activos remanentes con BSA para evitar posibles interacciones inespecíficas y se lavaron nuevamente con PBS-Tween. La fase de retención se realizó incubando las NPMs@pDA-Ab desactivadas con distintas concentraciones de *Legionella* a $37\ ^\circ\text{C}$ durante 45 minutos y bajo agitación continuada. Una vez retenida la bacteria en superficie se procedió al marcado con un anticuerpo secundario modificado con HRP y lavado con PBST. La enzima HRP se empleó a posteriori para cuantificar la cantidad de bacteria retenida en el inmunoensayo. Por lo tanto, la configuración final obtenida sería MNPs@pDA-Ab-bacteria-Ab-HRP (ver figura 8.3.1).

Finalmente, las nanopartículas fueron redispersadas en PBS con $1.5\ \text{mM}$ de hidroquinona como mediador electroquímico y depositadas sobre la superficie de una

tarjeta serigrafiada (usando un soporte magnético) cubriendo por completo los tres electrodos (trabajo, referencia (Ag) y contraelectrodo) (ver figura 8.3.1). Las medidas electroquímicas se realizaron a un potencial de -150 mV vs. pseudoreferencia de Ag incorporado en la tarjeta. Una vez alcanzada una lectura de corriente estable se procedió a la adición de 15 μL de H_2O_2 (3.5 mM) sobre el dispositivo, con el fin de medir la variación de corriente producida por la reacción enzimática, ya que es proporcional a la concentración de bacteria retenida en la superficie de las nanopartículas. La duración total del protocolo de modificación y medida fue aproximadamente de 3-4 h.

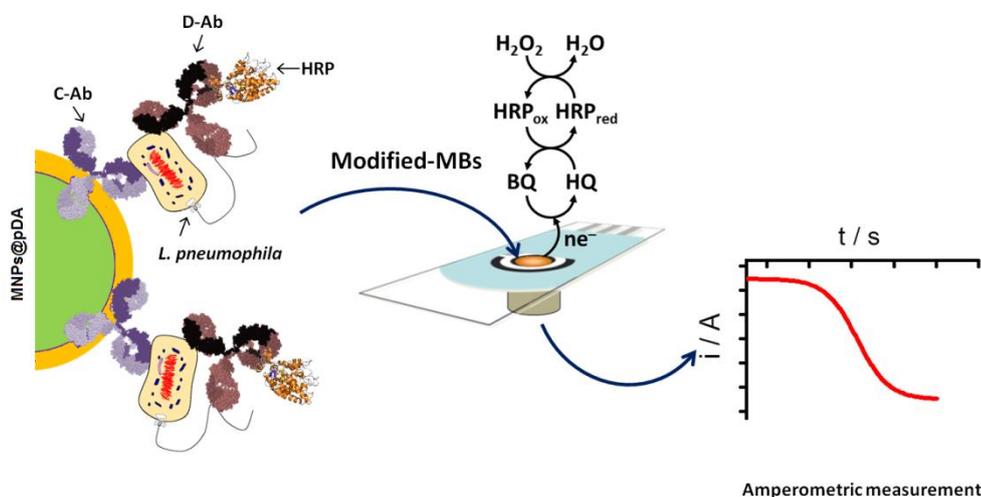


Figura 8.3.1 Esquema del inmunoensayo realizado en la superficie de las nanopartículas magnéticas, montaje del dispositivo electroquímico y señal obtenida durante la etapa de cuantificación.

Con la finalidad de estudiar las posibles adsorciones inespecíficas sobre la superficie de las nanopartículas se analizó la respuesta del dispositivo electroquímico en ausencia y presencia de *Legionella* (1.0×10^6 CFU mL^{-1}). Para ello, se emplearon distintas disoluciones: PBST^4 -BSA⁵ (1% w/v), PBST-BSA-NaCl (1% w/v, 1.5 M) o PBST-leche UHT-NaCl (0.3 %v/v, 1.5 M), PBST-BSA (1% w/v). Los resultados mostraron una mayor relación señal específica/no específica en presencia de BSA y una menor

⁴ Tampón fosfato-Tween

⁵ Albúmina bovina

dispersión de resultados en ausencia de NaCl. Por lo tanto, la disolución de PBST-BSA (1% w/v) fue utilizada en los ensayos posteriores.

En condiciones óptimas de trabajo y sin etapa de pre-concentración previa el inmunoensayo electroquímico fue capaz de detectar una concentración mínima de *Legionella* de $\sim 1.0 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ presentando un rango lineal hasta $\sim 1.0 \times 10^8$ CFU mL⁻¹. La reproducibilidad y repetitividad del ensayo electroquímico presentaron valores alrededor de 5.9 y 8.5 % respectivamente, demostrando tanto la fiabilidad del dispositivos como del protocolo ensayado.

Asimismo, se realizó un estudio de estabilidad del anticuerpo de captura en la superficie de las nanopartículas. Este estudio se llevó a cabo analizando durante un mes la respuesta del inmunoensayo frente a una concentración de *Legionella* de 1.0×10^6 CFU mL⁻¹. Las nanopartículas modificadas para este estudio fueron suspendidas en PBS y almacenadas en nevera a 4 °C. Los resultados mostraron que durante el período estudiado las características de bioreconocimiento no variaron considerablemente, reteniendo un 90% de respuesta al final del estudio.

También se realizó un estudio de selectividad frente a posibles bacterias interferentes (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas* y *Salmonella*). Para realizar el estudio de interferentes se estableció una concentración de referencia de *Legionella* y unas concentraciones fijas de bacterias (1.0×10^6 CFU mL⁻¹). Posteriormente, se compararon las señales analíticas obtenidas en condiciones óptimas después de realizar el inmunoensayo electroquímico. Los resultados obtenidos revelaron la ausencia de fenómenos de interferencias debidos a interacciones cruzadas con el resto de bacterias, validando así, la selectividad del inmunoensayo.

Por otro lado, con el fin de disminuir el límite de detección del inmunoensayo se incluyó un proceso de pre-concentración en dos etapas. Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones conocidas entre 1.0×10^1 - 1.0×10^5 CFU mL⁻¹. En la primera etapa, la filtración fue a vacío con una membrana porosa de 0.22 μm. Dicha membrana fue cortada en pequeños trozos y suspendida en un tubo tipo *Falcon* con una disolución de PBST y se agitó en un vórtex durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo tipo *Falcon* que incorporaba una nueva membrana de 0.22 μm de tamaño de poro y seguidamente fue centrifugado durante 1 min a 1500 rpm. El volumen final de muestra conseguido fue ~ 500 μL con un factor de concentración teórico de aproximadamente 3 órdenes de magnitud.

Finalmente, los resultados alcanzados demostraron la posibilidad de disminuir la concentración de *Legionella* detectada hasta 10 CFU mL⁻¹, es decir, tres órdenes de magnitud inferior al protocolo sin concentración previa y además la posibilidad de ser empleado en el estudio de muestras contaminadas de concentraciones moderadas de *Legionella*. Pese a los buenos resultados obtenidos el límite de detección no llega a ser el necesario para su utilización en el control epidemiológico de *Legionella*. Según la legislación española (norma ISO 11731/1998, 2004 ó NF T 90-431/3003), dicho límite está situado en < 100 CFU L⁻¹ (0.1 CFU mL⁻¹). Sin embargo no se descarta que en un futuro exista la posibilidad de incluir otros procesos adicionales o más elaborados de concentración que podrían disminuir aún más el límite de detección y aproximarse así, al valor exigido por la legislación vigente. Por otro lado, cabe destacar que bajo la presente aproximación se podría obtener una respuesta positiva o negativa ante la presencia de la bacteria tras realizar un análisis de 3 horas de duración aproximada, mientras que el método de referencia empleado (cultivo en placa) requiere al menos de 10 días de cultivo y su posterior identificación.

CONCLUSIONES

En la presente memoria de tesis doctoral se han desarrollado biosensores nanoestructurados basados en el empleo de nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina. Los procesos de síntesis, modificación y construcción de los dispositivos electroquímicos han sido evaluados convenientemente y han permitido valorar la eficiencia y aplicabilidad de los dispositivos ensayados.

A modo de resumen podemos citar las siguientes conclusiones:

- 1) Se han sintetizado NPMs mediante el método de co-precipitación química y demostrado que es un método conveniente y adecuado para fines analíticos.
- 2) Se ha determinado el tamaño, estructura, comportamiento magnético y composición de fase de las NPMs mediante técnicas de caracterización de materiales, tales como: SEM, TEM, XPS, XRD, AFM, análisis térmico, estudio de susceptibilidad magnética, técnicas espectroscópicas, etc.
- 3) Se ha modificado la superficie de las NPMs mediante polimerización de pDA y establecido la derivatización y composición de las NPMs modificadas mediante el uso de las técnicas instrumentales pertinentes.
- 4) Se ha demostrado que el tiempo de polimerización afecta tanto al grosor de la capa polimérica como a su estado de oxidación.
- 5) Se ha demostrado que mediante el proceso de oxidación térmica es posible incrementar la cantidad de grupos reactivos (quinonas) en la superficie del polímero y aumentar así, la cantidad de material retenido.
- 6) Se han utilizado las NPMs@pDA como sustrato de inmovilización de material biológico (enzimas y anticuerpo) y posteriormente han sido empleadas en el desarrollo de biosensores enzimáticos amperométricos de primera y segunda generación para la detección de peróxido de hidrógeno, glucosa y compuestos fenólicos.

- 7) Se ha desarrollado una magnetoinmunoplateforma basada en el empleo de las NPMs@pDA para la determinación de *Legionella Neumophila*.
- 8) Se han aplicado los biosensores enzimáticos e inmunosensores desarrollados al análisis de muestras reales y/o complejas prestando especial atención a los fenómenos de interferencia, y comparando los resultados con métodos estándares.

REFERENCIAS

1. Thévenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(1–2): p. 121-131.
2. Scheller, F.W., et al., *Research and development in biosensors*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001. **12**(1): p. 35-40.
3. D'Orazio, P., *Biosensors in clinical chemistry*. *Clinica Chimica Acta*, 2003. **334**(1–2): p. 41-69.
4. D'Orazio, P., *Biosensors in clinical chemistry — 2011 update*. *Clinica Chimica Acta*, 2011. **412**(19–20): p. 1749-1761.
5. Prodromidis, M.I. and M.I. Karayannis, *Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis*. *Electroanalysis*, 2002. **14**(4): p. 241-261.
6. Wang, J., *Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges*. *Electroanalysis*, 2001. **13**(12): p. 983-988.
7. Clark, L.C. and C. Lyons, *ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962. **102**(1): p. 29-45.
8. Updike, S.J. and G.P. Hicks, *The Enzyme Electrode*. *Nature*, 1967. **214**(5092): p. 986-988.
9. Guilbault, G.G. and G.J. Lubrano, *An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose*. *Analytica Chimica Acta*, 1973. **64**(3): p. 439-455.
10. Magner, E., *Trends in electrochemical biosensors[dagger]*. *Analyst*, 1998. **123**(10): p. 1967-1970.
11. Cass, A.E.G., et al., *Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose*. *Analytical Chemistry*, 1984. **56**(4): p. 667-671.
12. Frew, J.E. and H.A.O. Hill, *Electrochemical biosensors*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(15): p. 933A-944A.
13. Hilditch, P.I. and M.J. Green, *Disposable electrochemical biosensors*. *Analyst*, 1991. **116**(12): p. 1217-1220.
14. Matthews, D.R., et al., *PEN-SIZED DIGITAL 30-SECOND BLOOD GLUCOSE METER*. *The Lancet*, 1987. **329**(8536): p. 778-779.
15. Murray, R.W., A.G. Ewing, and R.A. Durst, *Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(5): p. 379A-390A.
16. Ohara, T.J., R. Rajagopalan, and A. Heller, *"Wired" Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose or Lactate in the Presence of Interfering Substances*. *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(15): p. 2451-2457.
17. Willner, I., et al., *Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(42): p. 10321-10322.
18. Bindra, D.S., et al., *Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring*. *Analytical Chemistry*, 1991. **63**(17): p. 1692-1696.
19. Bridle, H., B. Miller, and M.P.Y. Desmulliez, *Application of microfluidics in waterborne pathogen monitoring: A review*. *Water Research*, 2014. **55**(0): p. 256-271.
20. Castillo, J., et al., *Biosensors for life quality: Design, development and applications*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004. **102**(2): p. 179-194.
21. Gooding, J.J., *Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **559**(2): p. 137-151.
22. Mortari, A. and L. Lorenzelli, *Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **60**(0): p. 8-21.

23. Nguyen, P.-D., et al., *Magnetic silica nanotube-assisted impedimetric immunosensor for the separation and label-free detection of Salmonella typhimurium*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **197**(0): p. 314-320.
24. Perumal, V. and U. Hashim, *Advances in biosensors: Principle, architecture and applications*. *Journal of Applied Biomedicine*, 2014. **12**(1): p. 1-15.
25. Rodriguez-Mozaz, S., et al., *Biosensors for environmental monitoring: A global perspective*. *Talanta*, 2005. **65**(2): p. 291-297.
26. Singh, R., et al., *Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **197**(0): p. 385-404.
27. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz, *Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example*. *Talanta*, 2005. **65**(2): p. 313-323.
28. Velusamy, V., et al., *An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors*. *Biotechnology Advances*, 2010. **28**(2): p. 232-254.
29. Yáñez-Sedeño, P., et al., *Biosensors in forensic analysis. A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **823**(0): p. 1-19.
30. Guo, S. and E. Wang, *Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **598**(2): p. 181-192.
31. Huang, X.-J. and Y.-K. Choi, *Chemical sensors based on nanostructured materials*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **122**(2): p. 659-671.
32. Pingarrón, J.M., P. Yáñez-Sedeño, and A. González-Cortés, *Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors*. *Electrochimica Acta*, 2008. **53**(19): p. 5848-5866.
33. Pumera, M., et al., *Electrochemical nanobiosensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **123**(2): p. 1195-1205.
34. Rajesh, T. Ahuja, and D. Kumar, *Recent progress in the development of nanostructured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009. **136**(1): p. 275-286.
35. Schmidtke, D.W., et al., *Measurement and modeling of the transient difference between blood and subcutaneous glucose concentrations in the rat after injection of insulin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(1): p. 294-299.
36. KULYS, et al., *Metabolite determination in foodstuffs by enzyme analyzers*. Vol. 11. 1989, Hoboken, NJ, ETATS-UNIS: Wiley.
37. Abad, A. and A. Montoya, *Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. **42**(8): p. 1818-1823.
38. Abad, A., M.J. Moreno, and A. Montoya, *Development of Monoclonal Antibody-Based Immunoassays to the N-Methylcarbamate Pesticide Carbofuran*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(6): p. 2475-2485.
39. Campanella, L., et al., *Reliable new immunosensor for atrazine pesticide analysis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(1): p. 50-62.
40. Lee, J.K., et al., *Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Fungicide Fenarimol*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(24): p. 7206-7213.
41. López, M.A., et al., *Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine*. *Journal of Molecular Recognition*, 1998. **11**(1-6): p. 178-181.

42. Mallat, E., et al., *Immunosensors for pesticide determination in natural waters*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2001. **20**(3): p. 124-132.
43. Avelino, K.Y.P.S., et al., *Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples*. Synthetic Metals, 2014. **194**(0): p. 102-108.
44. Bertok, T., et al., *Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles*. Talanta, 2013. **108**(0): p. 11-18.
45. Hu, F., et al., *Multi-wall carbon nanotube-polyaniline biosensor based on lectin-carbohydrate affinity for ultrasensitive detection of Con A*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **34**(1): p. 202-207.
46. Luna, D.M.N., et al., *Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue*. Chemistry and Physics of Lipids, 2014. **180**(0): p. 7-14.
47. Pei, Z., et al., *Real-time analysis of the carbohydrates on cell surfaces using a QCM biosensor: a lectin-based approach*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 200-205.
48. Wang, Y., et al., *Monitoring of Escherichia coli O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor*. Food Chemistry. **136**(3-4): p. 1303-1308.
49. Yang, H., et al., *Detection and discrimination of alpha-fetoprotein with a label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor array based on lectin functionalized carbon nanotubes*. Talanta, 2013. **111**(0): p. 62-68.
50. Berney, H., et al., *A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2000. **68**(1-3): p. 100-108.
51. Drummond, T.G., M.G. Hill, and J.K. Barton, *Electrochemical DNA sensors*. Nat Biotech, 2003. **21**(10): p. 1192-1199.
52. Gooding, J.J., *Electrochemical DNA Hybridization Biosensors*. Electroanalysis, 2002. **14**(17): p. 1149-1156.
53. Kafka, J., et al., *A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(25): p. 7467-7474.
54. Zhang, Z.-L., et al., *Electrochemical DNA sensing based on gold nanoparticle amplification*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **381**(4): p. 833-838.
55. Chen, J., et al., *A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanocluster for ochratoxin A detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **57**(0): p. 226-231.
56. Erdem, A. and G. Congur, *Voltammetric aptasensor combined with magnetic beads assay developed for detection of human activated protein C*. Talanta, 2014. **128**(0): p. 428-433.
57. Hu, K., et al., *A carbon nanotubes based fluorescent aptasensor for highly sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibitor screening in natural extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **95**(0): p. 164-168.
58. Ke, H., et al., *A Femtomolar Level 17 β -estradiol Electrochemical Aptasensor Constructed On Hierarchical Dendritic Gold Modified Boron-Doped Diamond Electrode*. Electrochimica Acta, 2014. **137**(0): p. 146-153.

59. Wang, Y., et al., *Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual backfillers*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **60**(0): p. 218-223.
60. Zhang, J., et al., *Amplified amperometric aptasensor for selective detection of protein using catalase-functional DNA–PtNPs dendrimer as a synergetic signal amplification label*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **60**(0): p. 224-230.
61. Du, L., et al., *Piezoelectric olfactory receptor biosensor prepared by aptamer-assisted immobilization*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. **187**(0): p. 481-487.
62. Kim, S. and S.-J. Choi, *A lipid-based method for the preparation of a piezoelectric DNA biosensor*. *Analytical Biochemistry*, 2014. **458**(0): p. 1-3.
63. Shang, Z.-j., et al., *A Rapid Detection of Pesticide Residue Based on Piezoelectric Biosensor*. *Procedia Engineering*, 2011. **15**(0): p. 4480-4485.
64. Su, L., et al., *Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **46**(0): p. 155-161.
65. Zhao, Y., et al., *Biomolecule-adsorption-dependent piezoelectric output of ZnO nanowire nanogenerator and its application as self-powered active biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **57**(0): p. 269-275.
66. Yakovleva, M., S. Bhand, and B. Danielsson, *The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **766**(0): p. 1-12.
67. Harborn, U., et al., *Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood*. *Clinica Chimica Acta*, 1997. **267**(2): p. 225-237.
68. Wandermur, G., et al., *Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **54**(0): p. 661-666.
69. Mashhadizadeh, M.H. and R.P. Talemi, *A novel optical DNA biosensor for detection of trace amounts of mercuric ions using gold nanoparticles introduced onto modified glass surface*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014. **132**(0): p. 403-409.
70. Fortugno, C., et al., *Optical biosensor analysis in studying new synthesized bicalutamide analogs binding to androgen receptor*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014. **95**(0): p. 151-157.
71. Cao, J., et al., *Wavelength-based localized surface plasmon resonance optical fiber biosensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. **181**(0): p. 611-619.
72. Ahmadi, H., et al., *Evaluation of single virus detection through optical biosensor based on microsphere resonator*. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 2014. **125**(14): p. 3599-3602.
73. Chen, S., et al., *Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(7): p. 1268-1274.
74. Chinnadayala, S.R., et al., *A novel amperometric alcohol biosensor developed in a 3rd generation bioelectrode platform using peroxidase coupled ferrocene activated alcohol oxidase as biorecognition system*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **55**(0): p. 120-126.
75. ElKaoutit, M., et al., *A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion–Sonogel–Carbon composite*. *Electrochimica Acta*, 2008. **53**(24): p. 7131-7137.

76. Gupta, V., *ZnO based third generation biosensor*. Thin Solid Films, 2010. **519**(3): p. 1141-1144.
77. Jindal, K., M. Tomar, and V. Gupta, *Inducing electrocatalytic functionality in ZnO thin film by N doping to realize a third generation uric acid biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **55**(0): p. 57-65.
78. Wu, L., X. Zhang, and J. Chen, *A new third-generation biosensor for superoxide anion based on dendritic gold nanostructure*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **726**(0): p. 112-118.
79. Zeng, X., et al., *A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on DNA functionalized carbon nanotubes*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **25**(4): p. 896-900.
80. Marcus, R.A., *Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1993. **32**(8): p. 1111-1121.
81. Zhang, C., et al., *Enhanced removal of trace arsenate by magnetic nanoparticles modified with arginine and lysine*. Chemical Engineering Journal, 2014. **254**(0): p. 340-348.
82. Wierucka, M. and M. Biziuk, *Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **59**(0): p. 50-58.
83. Wang, J., et al., *Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles impregnated chitosan beads for arsenic removal from water*. Chemical Engineering Journal, 2014. **251**(0): p. 25-34.
84. Thatai, S., et al., *Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review*. Microchemical Journal, 2014. **116**(0): p. 62-76.
85. Cao, M., et al., *Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis*. Trends in Food Science & Technology, 2012. **27**(1): p. 47-56.
86. Alcantara, D. and L. Josephson, *Chapter 11 - Magnetic Nanoparticles for Application in Biomedical Sensing*, in *Frontiers of Nanoscience*, M.d.I.F. Jesus and V. Grazu, Editors. 2012, Elsevier. p. 269-289.
87. Chatterjee, K., et al., *Core/shell nanoparticles in biomedical applications*. Advances in Colloid and Interface Science, 2014. **209**(0): p. 8-39.
88. Lee, D.J., Y.T. Oh, and E.S. Lee, *Surface charge switching nanoparticles for magnetic resonance imaging*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **471**(1-2): p. 127-134.
89. Lim, J. and S.A. Majetich, *Composite magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedicine: Manipulation and imaging*. Nano Today, 2013. **8**(1): p. 98-113.
90. Liu, Y. and N. Zhang, *Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging*. Biomaterials, 2012. **33**(21): p. 5363-5375.
91. Tartaj, P., et al., *Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **290-291**, **Part 1**(0): p. 28-34.
92. Chomoucka, J., et al., *Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering*. Pharmacological Research, 2010. **62**(2): p. 144-149.
93. Sun, C., J.S.H. Lee, and M. Zhang, *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(11): p. 1252-1265.

94. Laurent, S., et al., *Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011. **166**(1–2): p. 8-23.
95. Niemirowicz, K., et al., *Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine*. *Advances in Medical Sciences*, 2012. **57**(2): p. 196-207.
96. Shubayev, V.I., T.R. Pisanic II, and S. Jin, *Magnetic nanoparticles for theragnostics*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(6): p. 467-477.
97. Unsoy, G., et al., *Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014. **62**(0): p. 243-250.
98. Zhu, L., Y. Cao, and G. Cao, *Electrochemical sensor based on magnetic molecularly imprinted nanoparticles at surfactant modified magnetic electrode for determination of bisphenol A*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **54**(0): p. 258-261.
99. Ranjith Kumar, E., et al., *Synthesis of Mn substituted CuFe₂O₄ nanoparticles for liquefied petroleum gas sensor applications*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **191**(0): p. 186-191.
100. Liu, X., et al., *Ultrasensitive detection of deltamethrin by immune magnetic nanoparticles separation coupled with surface plasmon resonance sensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 328-334.
101. Ensafi, A.A., et al., *Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA based on NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles decorated MWCNTs as a novel electrochemical sensor using adsorptive stripping voltammetry*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. **177**(0): p. 634-642.
102. Ensafi, A.A., et al., *Characterization of carbon nanotubes decorated with NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles as a novel electrochemical sensor: Application for highly selective determination of sotalol using voltammetry*. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. **33**(1): p. 202-208.
103. Zhang, Y., et al., *A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(9–10): p. 2121-2126.
104. Liu, Z., et al., *A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **533**(1): p. 3-9.
105. Li, J., X. Wei, and Y. Yuan, *Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009. **139**(2): p. 400-406.
106. Zhang, J.-G., et al., *An Immunosensor for Microcystins Based on Fe₃O₄ @Au Magnetic Nanoparticle Modified Screen-Printed Electrode*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013. **41**(9): p. 1353-1358.
107. Wang, S., et al., *Application of indium tin oxide device in gold-coated magnetic iron solid support enhanced electrochemiluminescent immunosensor for determination of carcinoma embryonic antigen*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **171–172**(0): p. 891-898.
108. Li, S., et al., *A novel immunosensor for squamous cell carcinoma antigen determination based on CdTe@Carbon dots nanocomposite electrochemiluminescence resonance energy transfer*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **197**(0): p. 43-49.

109. Li, J., et al., *Piezoelectric immunosensor based on magnetic nanoparticles with simple immobilization procedures*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **481**(2): p. 191-198.
110. Sinha, B., et al., *Planar Hall magnetoresistive aptasensor for thrombin detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 140-144.
111. Liu, Y.-M., et al., *Label-free electrochemiluminescence aptasensor using Ru(bpy)₃²⁺ functionalized dopamine-melanin colloidal nanospheres and gold nanoparticles as signal-amplifying tags*. *Electrochimica Acta*, 2014. **129**(0): p. 222-228.
112. Jeon, W., et al., *A colorimetric aptasensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles*. *Analytical Biochemistry*, 2013. **439**(1): p. 11-16.
113. Leslie-Pelecky, D.L. and R.D. Rieke, *Magnetic Properties of Nanostructured Materials*. *Chemistry of Materials*, 1996. **8**(8): p. 1770-1783.
114. Reis, M., *Chapter 7 - Diamagnetism*, in *Fundamentals of Magnetism*, M. Reis, Editor. 2013, Academic Press: Boston. p. 74-92.
115. Misra, P.K., *Chapter 12 - Diamagnetism and Paramagnetism*, in *Physics of Condensed Matter*, P.K. Misra, Editor. 2012, Academic Press: Boston. p. 369-407.
116. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003. **36**(13): p. R167.
117. Reis, M., *Chapter 8 - Paramagnetism*, in *Fundamentals of Magnetism*, M. Reis, Editor. 2013, Academic Press: Boston. p. 93-126.
118. Reis, M., *chapter 9 - Magnetic Interactions*, in *Fundamentals of Magnetism*, M. Reis, Editor. 2013, Academic Press: Boston. p. 128-145.
119. Kaufman, A.A., R.O. Hansen, and R.L.K. Kleinberg, *Chapter 6 Paramagnetism, Diamagnetism, and Ferromagnetism*, in *Methods in Geochemistry and Geophysics*, R.O.H. A.A. Kaufman and L.K.K. Robert, Editors. 2008, Elsevier. p. 207-254.
120. Reis, M., *Chapter 1 - Introduction*, in *Fundamentals of Magnetism*, M. Reis, Editor. 2013, Academic Press: Boston. p. 2-12.
121. Chen, C.-W., *CHAPTER 2 - FERROMAGNETISM AND FERRIMAGNETISM*, in *Magnetism and Metallurgy of Soft Magnetic Materials*, C.-W. Chen, Editor. 1977, Elsevier. p. 15-60.
122. Kittel, C., *Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles*. *Physical Review*, 1946. **70**(11-12): p. 965-971.
123. Butler, R.F. and S.K. Banerjee, *Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite*. *Journal of Geophysical Research*, 1975. **80**(29): p. 4049-4058.
124. Mørup, S., M.F. Hansen, and C. Frandsen, *1.14 - Magnetic Nanoparticles*, in *Comprehensive Nanoscience and Technology*, D.L. Andrews, G.D. Scholes, and G.P. Wiederrecht, Editors. 2011, Academic Press: Amsterdam. p. 437-491.
125. Rudolf, H., D. Silvio, and R. Michael, *Effects of size distribution on hysteresis losses of magnetic nanoparticles for hyperthermia*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2008. **20**(38): p. 385214.
126. Xavier, B. and L. Amílcar, *Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2002. **35**(6): p. R15.
127. Fleet, M.E., *The structure of magnetite: Symmetry of cubic spinels*. *Journal of Solid State Chemistry*, 1986. **62**(1): p. 75-82.

128. Cornell, R.M. and U. Schwertmann, *Introduction to the Iron Oxides*, in *The Iron Oxides*. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-7.
129. Cornell, R.M. and U. Schwertmann, *Crystal Structure*, in *The Iron Oxides*. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 9-38.
130. Cornell, R.M. and U. Schwertmann, *Synthesis*, in *The Iron Oxides*. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 525-540.
131. Lu, A.-H., E.L. Salabas, and F. Schüth, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(8): p. 1222-1244.
132. Hao, R., et al., *Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles*. Advanced Materials, 2010. **22**(25): p. 2729-2742.
133. Ghosh Chaudhuri, R. and S. Paria, *Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications*. Chemical Reviews, 2011. **112**(4): p. 2373-2433.
134. Gao, J., H. Gu, and B. Xu, *Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(8): p. 1097-1107.
135. Cornell, R.M. and U. Schwertmann, *Characterization*, in *The Iron Oxides*. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 139-183.
136. LaMer, V.K. and R.H. Dinegar, *Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols*. Journal of the American Chemical Society, 1950. **72**(11): p. 4847-4854.
137. Sun, S., et al., *Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices*. Science, 2000. **287**(5460): p. 1989-1992.
138. Shevchenko, E.V., et al., *Colloidal Synthesis and Self-Assembly of CoPt₃ Nanocrystals*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(38): p. 11480-11485.
139. Park, J., et al., *Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals*. Nat Mater, 2004. **3**(12): p. 891-895.
140. Chen, Q., et al., *Synthesis of superparamagnetic MgFe₂O₄ nanoparticles by coprecipitation*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. **194**(1-3): p. 1-7.
141. Langer, R., *Drugs on Target*. Science, 2001. **293**(5527): p. 58-59.
142. Alivisatos, P., *The use of nanocrystals in biological detection*. Nat Biotech, 2004. **22**(1): p. 47-52.
143. Ahn, J.-H., et al., *Heterogeneous Three-Dimensional Electronics by Use of Printed Semiconductor Nanomaterials*. Science, 2006. **314**(5806): p. 1754-1757.
144. Tamerler, C. and M. Sarikaya, *Molecular biomimetics: Utilizing nature's molecular ways in practical engineering*. Acta Biomaterialia, 2007. **3**(3): p. 289-299.
145. Love, J.C., et al., *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1170.
146. Croll, T.I., et al., *Controllable Surface Modification of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects*. Biomacromolecules, 2004. **5**(2): p. 463-473.
147. WAITE, J.H. and M.L. TANZER, *Polyphenolic Substance of Mytilus edulis: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline*. Science, 1981. **212**(4498): p. 1038-1040.

148. Waite, J.H. and X. Qin, *Polyphosphoprotein from the Adhesive Pads of Mytilus edulis*. *Biochemistry*, 2001. **40**(9): p. 2887-2893.
149. Harrington, M.J., et al., *Iron-Clad Fibers: A Metal-Based Biological Strategy for Hard Flexible Coatings*. *Science*, 2010. **328**(5975): p. 216-220.
150. Lee, H., et al., *Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings*. *Science*, 2007. **318**(5849): p. 426-430.
151. Katz, J.L., A.H. Newman, and S. Izenwasser, *Relations Between Heterogeneity of Dopamine Transporter Binding and Function and the Behavioral Pharmacology of Cocaine*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1997. **57**(3): p. 505-512.
152. Hurley, M.J. and P. Jenner, *What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease?* *Pharmacology & Therapeutics*, 2006. **111**(3): p. 715-728.
153. Di Giovanni, G., V. Di Matteo, and E. Esposito, *Preface*, in *Progress in Brain Research*, V.D.M. Giuseppe Di Giovanni and E. Ennio, Editors. 2008, Elsevier. p. ix.
154. Lee, H., J. Rho, and P.B. Messersmith, *Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings*. *Advanced Materials*, 2009. **21**(4): p. 431-434.
155. Faure, E., et al., *Catechols as versatile platforms in polymer chemistry*. *Progress in Polymer Science*, 2013. **38**(1): p. 236-270.
156. Zhu, L.-P., et al., *Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. **86**(1): p. 111-118.
157. Yang, K., et al., *Polydopamine-mediated surface modification of scaffold materials for human neural stem cell engineering*. *Biomaterials*, 2012. **33**(29): p. 6952-6964.
158. Luo, R., et al., *Improved immobilization of biomolecules to quinone-rich polydopamine for efficient surface functionalization*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **106**(0): p. 66-73.
159. Li, Y., et al., *Highly sensitive phenolic biosensor based on magnetic polydopamine-laccase-Fe₃O₄ bionanocomposite*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **168**(0): p. 46-53.
160. Ham, H.O., et al., *Facile DNA Immobilization on Surfaces through a Catecholamine Polymer*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011. **50**(3): p. 732-736.
161. d'Ischia, M., et al., *Chemical and Structural Diversity in Eumelanins: Unexplored Bio-Optoelectronic Materials*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(22): p. 3914-3921.
162. Ryu, J., et al., *Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Universal Route to Hydroxyapatite Crystallization*. *Advanced Functional Materials*, 2010. **20**(13): p. 2132-2139.
163. Lee, M., et al., *Mussel-inspired functionalization of carbon nanotubes for hydroxyapatite mineralization*. *Journal of Materials Chemistry*, 2010. **20**(40): p. 8848-8853.
164. Kim, S. and C.B. Park, *Dopamine-Induced Mineralization of Calcium Carbonate Vaterite Microspheres*. *Langmuir*, 2010. **26**(18): p. 14730-14736.
165. Zhang, M., et al., *Preparation and Characterization of Polydopamine-coated Silver Core/Shell Nanocables*. *Chemistry Letters*, 2010. **39**(6): p. 552-553.

166. Sureshkumar, M., P.-N. Lee, and C.-K. Lee, *Stepwise assembly of multimetallic nanoparticles via self-polymerized polydopamine*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(33): p. 12316-12320.
167. Long, Y., et al., *Rapid sintering of silver nanoparticles in an electrolyte solution at room temperature and its application to fabricate conductive silver films using polydopamine as adhesive layers*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(13): p. 4875-4881.
168. Lee, Y. and T.G. Park, *Facile Fabrication of Branched Gold Nanoparticles by Reductive Hydroxyphenol Derivatives*. Langmuir, 2011. **27**(6): p. 2965-2971.
169. Kobayashi, S. and A. Makino, *Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry*. Chemical Reviews, 2009. **109**(11): p. 5288-5353.
170. Marjasvaara, A., et al., *Laccase-Catalyzed Polymerization of Two Phenolic Compounds Studied by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight and Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry with Collision-Induced Dissociation Experiments*. Biomacromolecules, 2006. **7**(5): p. 1604-1609.
171. Tan, Y., et al., *Polymeric Bionanocomposite Cast Thin Films with In Situ Laccase-Catalyzed Polymerization of Dopamine for Biosensing and Biofuel Cell Applications*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(15): p. 5016-5024.
172. Ouyang, R., et al., *A Molecularly Imprinted Copolymer Designed for Enantioselective Recognition of Glutamic Acid*. Advanced Functional Materials, 2007. **17**(16): p. 3223-3230.
173. Zhang, Y., et al., *Assembly of Poly(dopamine) Films Mixed with a Nonionic Polymer*. Langmuir, 2012. **28**(51): p. 17585-17592.
174. Wei, Q., et al., *Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings*. Polymer Chemistry, 2010. **1**(9): p. 1430-1433.
175. Wang, X., B. Jin, and X. Lin, *In-situ FTIR Spectroelectrochemical Study of Dopamine at a Glassy Carbon Electrode in a Neutral Solution*. Analytical Sciences, 2002. **18**(8): p. 931-933.
176. Li, H., et al., *Use of surface plasmon resonance to investigate lateral wall deposition kinetics and properties of polydopamine films*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **41**(0): p. 809-814.
177. Gidanian, S. and P.J. Farmer, *Redox behavior of melanins: direct electrochemistry of dihydroxyindole-melanin and its Cu and Zn adducts*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002. **89**(1-2): p. 54-60.
178. Łuczak, T., *Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(19): p. 5725-5731.
179. Dreyer, D.R., et al., *Elucidating the Structure of Poly(dopamine)*. Langmuir, 2012. **28**(15): p. 6428-6435.
180. Zhao, Y., et al., *Synthesis, growth mechanism of different Cu nanostructures and their application for non-enzymatic glucose sensing*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2012. **409**(0): p. 105-111.
181. Della Vecchia, N.F., et al., *Building-Block Diversity in Polydopamine Underpins a Multifunctional Eumelanin-Type Platform Tunable Through a Quinone Control Point*. Advanced Functional Materials, 2013. **23**(10): p. 1331-1340.

182. Ball, V., et al., *Kinetics of polydopamine film deposition as a function of pH and dopamine concentration: Insights in the polydopamine deposition mechanism*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **386**(1): p. 366-372.
183. Ju, K.-Y., et al., *Bioinspired Polymerization of Dopamine to Generate Melanin-Like Nanoparticles Having an Excellent Free-Radical-Scavenging Property*. Biomacromolecules, 2011. **12**(3): p. 625-632.
184. Hedlund, J., et al., *Change of Colloidal and Surface Properties of Mytilus edulis Foot Protein 1 in the Presence of an Oxidation (NaIO₄) or a Complex-Binding (Cu²⁺) Agent*. Biomacromolecules, 2009. **10**(4): p. 845-849.
185. Cho, J.H., K. Shanmuganathan, and C.J. Ellison, *Bioinspired Catecholic Copolymers for Antifouling Surface Coatings*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(9): p. 3794-3802.
186. Burzio, L.A. and J.H. Waite, *Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides†*. Biochemistry, 2000. **39**(36): p. 11147-11153.
187. Faure, E., et al., *Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(22): p. 7901-7904.
188. Lee, H., N.F. Scherer, and P.B. Messersmith, *Single-molecule mechanics of mussel adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(35): p. 12999-13003.
189. Le, W.-Z. and Y.-Q. Liu, *Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potential cycling method and its characterization*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009. **141**(1): p. 147-153.
190. Liu, A., et al., *Polypyrrole Actuator with a Bioadhesive Surface for Accumulating Bacteria from Physiological Media*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2009. **1**(4): p. 951-955.
191. Yang, L., et al., *A Biomimetic Approach to Enhancing Interfacial Interactions: Polydopamine-Coated Clay as Reinforcement for Epoxy Resin*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011. **3**(8): p. 3026-3032.
192. Gao, J., et al., *Multifunctional Yolk–Shell Nanoparticles: A Potential MRI Contrast and Anticancer Agent*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(35): p. 11828-11833.
193. Zhou, W.-H., et al., *Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(5): p. 880-883.
194. Yu, B., et al., *Pdop layer exhibiting zwitterionicity: a simple electrochemical interface for governing ion permeability*. Chemical Communications, 2010. **46**(32): p. 5900-5902.
195. Bernsmann, F., et al., *Characterization of Dopamine–Melanin Growth on Silicon Oxide*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(19): p. 8234-8242.
196. Wu, C., et al., *Mussel-inspired porous SiO₂ scaffolds with improved mineralization and cytocompatibility for drug delivery and bone tissue engineering*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(45): p. 18300-18307.
197. Ouyang, R., J. Lei, and H. Ju, *Surface molecularly imprinted nanowire for protein specific recognition*. Chemical Communications, 2008(44): p. 5761-5763.

APÉNDICE