

Capítulo 3

INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS Y NANOCIENCIA

Enrique J. Millán Barrios*

Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias,
Departamento de Química, Grupo de Electroquímica,
Mérida, 5101, Venezuela.

CONTENIDO

3.1. Introducción	77
3.2. Funcionamiento	78
3.2.1. <i>Nanopartículas y nanomateriales en inmunosensores electroquímicos</i>	
3.2.2. <i>Vinculación con el transductor</i>	
3.2.3. <i>Comentarios sobre la reacción inmunobiológica</i>	
3.3. Preparación y caracterización	87
3.3.1. <i>Modificaciones superficiales</i>	
3.3.2. <i>Evaluación por técnicas electroquímicas</i>	
3.4. Aplicaciones	92
3.4.1. <i>Ciencias de la salud</i>	
3.4.2. <i>Medio ambiente</i>	
3.4.3. <i>Otras aplicaciones</i>	
3.5. Situación futura: dificultades y retos	97
Referencias	99

* eimb@ula.ve

3.1. Introducción

El término sensor se emplea para describir a un dispositivo que detecta o mide una propiedad física (o química) y la registra, muestra y, en todo caso, responde a ella¹; éste dispositivo dispone de un transductor, el cual se encarga de transformar un cambio observable (físico o químico) en una señal que pueda ser medida. Dentro del mundo de los sensores químicos existe una clase especial denominada Biosensores, el cual es un dispositivo que incorpora un elemento sensor biológico conectado a un transductor¹. Mientras que un inmunosensor, es un tipo de biosensor en el cual se integra una reacción inmunoquímica (antígeno-anticuerpo) a un transductor sólido que, al presentarse un reconocimiento biológico por parte del elemento inmovilizado sobre este transductor, generará una señal claramente diferenciable; de allí que este tipo de dispositivo puede acoplarse a un amplio número de técnicas del arsenal que generalmente se emplean en la química. Particularmente para el caso de los inmunosensores electroquímicos, de los cuales nos dedicaremos en este capítulo, las señales son generadas mediante reacciones de óxido-reducción que ocurren sobre la interfaz electródica o que se llevan a cabo en la cercanía de esta interfaz pero que, de manera directa o indirecta, hacen llegar a la superficie electródica la carga involucrada en el proceso redox de las reacciones inmunológicas bajo estudio; de esta manera la inmuno-reacción es detectada a través de técnicas electroquímicas que implican medidas conductimétricas, amperométricas, potenciométricas, voltamperométricas y capacitivas. Adicionalmente, dada la alta especificidad de las sustancias involucradas y que se promueven en el elemento sensor, por ejemplo interacción antígeno-anticuerpo, los inmunosensores son muy selectivos, sensibles y específicos, proceso que se ve potenciado con la incorporación de nanomateriales (NMs) al sistema, los cuales incrementan el área efectiva de contacto con las biomoléculas, promueven reacciones electrocatalíticas y de transferencia de carga y mejoran los límites de detección y cuantificación del método a emplear en la determinación del analito de interés.

Estos NMs pueden ser incorporados al inmunosensor a través de modificaciones físicas (por ejemplo: aplicación de oro coloidal) y/o químicas (por ejemplo: deposición de nanopartículas (NPs) metálicas de plata) de las superficies electródicas, lo cual puede llevarse a cabo mediante la inmovilización directa de nanotubos, NPs magnéticas, deposición electroquímica de diferentes metales (de manera individual o en compañía de otros metales), uso de nanogeles (por ejemplo: geles de quitosano modificados con NPs de oro), incorporación de macrociclos, generación de nanoclústeres o puntos cuánticos, entre otros. Estas modificaciones superficiales del sistema transductor tienen como objetivo mejorar el proceso de transferencia electrónica (o de carga), brindar mayor área superficial (incrementando la carga del elemento sensor) y de contacto para mejorar la interacción de los materiales biológicos utilizados en el inmunosensor como anticuerpos, enzimas, proteínas y hasta ADN (aunque en ese caso se trataría de un genosensor antes que un inmunosensor) y mejorar la respuesta general del transductor (corrientes de fondo y relación señal/ruido).

Dentro de las aplicaciones potenciales de los inmunosensores electroquímicos se ha reportado el desarrollo de inmunosensores para aplicaciones analíticas en el campo de la ciencia de la salud, medio ambiente, agricultura, alimentos y en el campo militar²⁻⁴, entre otros, siendo el reto actual el desarrollo de sistemas cada vez más pequeños, livianos,

robustos y capaces de detectar una gran variedad de analitos simultáneamente y de manera específica. Dado el creciente desarrollo y evolución de la nanotecnología y los NMs compuestos, se considera que en unas décadas se podrá romper la barrera del desarrollo de dispositivos portátiles hacia la producción de inmunosensores *in situ*. Por ahora se ha dedicado mucha atención al desarrollo de inmunosensores para el área de las ciencias de la salud, en especial empleando biomarcadores de diferentes tipos de cáncer^{5,6}, tal y como ha sido reportado por Ronkainen y Okon⁷. Sin embargo, aún no se disponen de inmunosensores electroquímicos comerciales, posiblemente por las limitaciones propias del proceso de modificación superficial con NMs, los cuales requieren de controles muy delicados del proceso de incorporación (o deposición reproducible) de las NPs al transductor, aunado al establecimiento de protocolos confiables de producción en masa que garanticen la inmovilización reproducible de los sistemas reporteros sobre las superficies electródicas.

Aspectos adicionales son los costos y disponibilidad de grandes cantidades de los biomarcadores, enzimas, proteínas recombinantes, anticuerpos y NMs en general, los cuales deben ser adquiridos, por ahora, de laboratorios altamente especializados; sin embargo, este es un aspecto que pudiese solventarse una vez establecidos los protocolos de producción y mantenimiento de todos los insumos para la preparación de los inmunosensores.

3.2. Funcionamiento

Siendo que un inmunosensor es un sensor de afinidad, éste puede concebirse como un tipo de transductor químico en el cual la reacción antígeno-anticuerpo es utilizada para obtener una medida con alta sensibilidad y selectividad, de allí que en el diagrama de bloques global del inmunosensor electroquímico, éste transductor (electrodo) ha de ser modificado con el sistema de reconocimiento y acoplado al resto del sistema, tal y como se muestra en la figura 3.1, y debe generarse un cambio electroquímico en el sistema de manera de relacionar cuantitativamente la señal (empleando un potencióstato/galvanostato) con la concentración del analito, o simplemente verificar la presencia de éste en el suero del paciente analizado.

De allí que el principal inconveniente que se debe resolver en los inmunosensores electroquímicos está relacionado con la amplificación de la señal electroquímica en el transductor, la cual proviene de la reacción inmunológica antígeno-anticuerpo; sin embargo, dado que en términos generales ni el anticuerpo ni el antígeno son electroactivos (no responden a cambios de potencial o corriente), se hace necesario establecer estrategias para solventar este inconveniente.

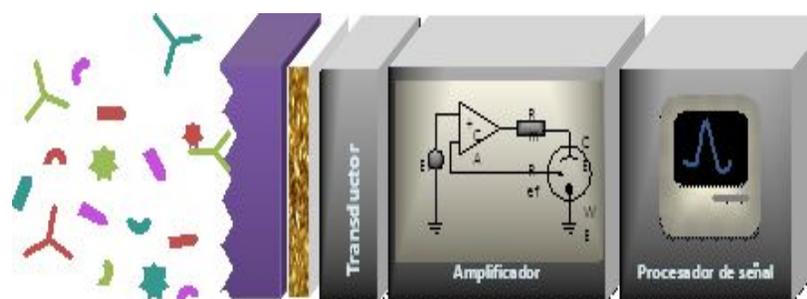


Fig. 3.1: Representación del diagrama de bloques de un inmunosensor electroquímico.

En tal sentido éstas han sido dirigidas a:

- (i) incorporar NPs metálicas para mejorar el proceso de transferencia de carga y aprovechar interacciones químicamente favorables, como las que ocurren entre el segmento amino de una proteína y el oro metálico, para facilitar la inmovilización del anticuerpo sobre el transductor electroquímico⁸ y además mejorar las propiedades electroquímicas del transductor (disminución de la relación señal-ruido).
- (ii) modificar anticuerpos secundarios con enzimas reporteras para monitorizar la reacción redox de la enzima, evaluar la inhibición de la respuesta catalítica con su sustrato o, en algunos casos, evaluar los productos electroactivos de la reacción enzimática.
- (iii) emplear marcadores macromoleculares redox⁹.
- (iv) implementar estrategias que no involucren el seguimiento de la transferencia de carga a través del uso de técnicas que registren los cambios capacitivos (resistivos) o disponer de anticuerpos modificados con NPs magnéticas.

La interacción irreversible antígeno (Ag)–anticuerpo (Ab) se lleva a cabo gracias al reconocimiento químico de los epítopes antigénicos por parte del anticuerpo específico a este antígeno, formando de esta manera el complejo Ag-Ab deseado. Actualmente, y gracias al desarrollo de la ingeniería genética, se emplean antígenos genéticamente modificados (hormonas o proteínas) para ciertas enfermedades, los cuales garantizan que interactuarán con anticuerpos monoclonales específicos de la enfermedad para la cual se desarrolla el inmunosensor. Como se indicó anteriormente, la interacción Ag-Ab no genera una reacción redox que se pudiese monitorizar, por lo que para solventar este problema se pueden “marcar” los anticuerpos con una enzima (figura 3.2a) que sea estable, muestre una transferencia electrónica rápida y mantenga su actividad en el tiempo.

Las enzimas más utilizadas son glucosa oxidasa (Gox), peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (ALP). En el mejor de los casos se modificará el anticuerpo con alguna de estas enzimas^{8,10,11} y se procederá a cuantificar la respuesta del sistema (figura 3.2b) directamente, aunque en otras ocasiones se hace necesario emplear anticuerpos secundarios (anti-IgG) marcados¹² (figura 3.2c) para lograr las mediciones analíticas.

Una vez que se genere el ciclo redox, al ponerse en contacto el inmunosensor electroquímico con la muestra de suero del paciente, la solución portadora de los anticuerpos de una determinada enfermedad o el sustrato de la enzima marcadora (rara vez se emplea

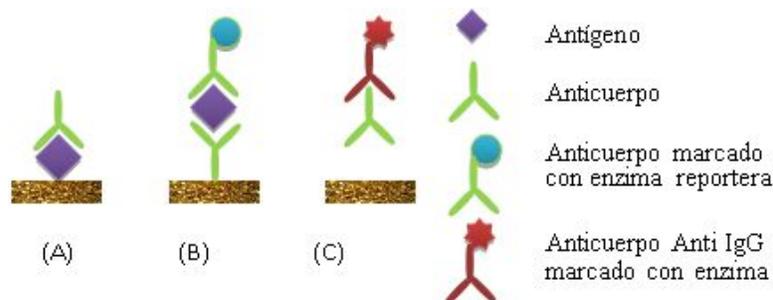


Fig. 3.2: Representación de los procesos de preparación de inmunosensores electroquímicos sobre superficies de NPs de oro.

directamente muestras de sangre debido a la presencia de otras proteínas y macromoléculas existente en una matriz tan compleja como esta), y ocurra la transferencia de carga en la interfaz electrodo/solución, el amplificador (generalmente un potenciostato/galvanostato o circuito de amplificadores operacionales equivalentes) procederá a registrar este proceso generando una señal medible y procesada a través del programa adecuado, produciendo una señal en voltaje, corriente o impedancia, la cual será utilizada para cuantificar el analito o simplemente confirmar la presencia de una determinada enfermedad.

3.2.1 NPs y NMs en inmunosensores electroquímicos

Como puede apreciarse de este libro, el campo de las NPs y NMs es un tema en continuo desarrollo, en el cual se publican a cada momento novedades y aplicaciones en el campo de los sensores, en especial de los biosensores; de allí que es probable que los lectores perciban la ausencia de algunos materiales empleados en esta área, sin embargo se intentará brindar una noción de aquellos elementos o materiales que son más empleados en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos.

En cuanto a la incorporación de NMs y NPs¹³ a los transductores electroquímicos, la literatura muestra que se ha evaluado un grupo muy amplio de ellos^{7,8} pudiéndolos clasificar en: nanotubos de carbono y sus alótropos, puntos cuánticos, nanocables, NPs semiconductoras, NPs metálicas y nanocompositos¹⁴.

Uno de los NMs más reportados en la literatura para la elaboración de inmunosensores son los nanotubos de carbono de pared simple (CNTs) o múltiple (MWCNTs), pudiéndose inclusive conseguir electrodos modificados con estos NMs y NPs de forma comercial, como por ejemplo los fabricados por empresas como la española Dropsens. Estos materiales han sido inmovilizados directamente sobre las superficies electródicas (transductor) o empleando diversas matrices poliméricas fabricadas de manera reproducible. Su uso se ha extendido gracias a que estos materiales poseen grandes áreas superficiales (incrementando la cantidad biomoléculas disponibles para la formación del inmunocomplejo)¹⁵, altas conductividades y velocidades de transferencia electrónica, además pueden ser modificados químicamente posibilitando la incorporación de grupos funcionales que sirvan de sitios de anclaje para proteínas, enzimas o anticuerpos, facilitando de esta manera el proceso de reconocimiento de los antígenos o anticuerpos de interés e impulsando la mejora de los límites de detección de los mismos^{16,17}. Sin embargo, todavía se requiere de una mayor investigación fundamental sobre el uso de nanotubos simples y multicapas, pues mientras algunos autores consideran que los primeros ofrecen mejores resultados y fácil manejo experimental, otros consideran que los segundos ofrecen mayores ventajas y favorecen la transferencia electrónica durante la respuesta del inmunosensor, aunque algunos investigadores consideran que los MWCNTs poseen áreas superficiales menores, limitando la interacción con los elementos biológicos macromoleculares, además se complica la modificación química y su control, favoreciendo la agregación de los nanotubos y disminuyendo su eficiencia¹⁵.

En cuanto al alótropo del carbono más empleado, el grafeno, éste presenta la ventaja de tener una mezcla de propiedades entre el grafito (y sus posibilidades de presentar una

variedad de grupos funcionales en su estructura) y los nanotubos de carbono (área superficial muy grande). Al tratarse de láminas planas se favorece la inmovilización de proteínas y de otras macromoléculas biológicas ampliando el espectro de inmunosensores a desarrollar. Ejemplos novedosos en los cuales se emplean estos NMs implican electrodos tipo FET (transistores de efecto de campo) en los cuales las superficies semiconductoras son modificadas con nanotubos de carbono multicapas sobre las cuales se adsorben o enlazan covalentemente anti-cuerpos anti IgG, permitiendo alcanzar límites de detección del orden de los pg/mL¹⁸. Existe un grupo interesante de nanotubos de carbono conocidos como nanocuernos y nanoconos de carbono que en realidad son láminas agregadas de grafeno¹⁹, estas superficies han mostrado ser adecuadas y sensibles para la generación de un inmunosensor para hepato-toxinas, en específico para microcistina con leucenina y arginina (L-R). Así, Ju *et al.*²⁰ reportaron la inmovilización covalente de la microcistina a través de los grupos ácidos presentes en la punta del cono del nanotubo; este agregado se empleó para impregnar la superficie de carbón vítreo y para posteriormente finalizar el ensamblaje del inmunosensor empleando anticuerpos anti-MC-LR marcados con HRP. Las respuestas voltamperométricas de pulso diferencial de soluciones de diferente concentración de la MC-LR (0,05 a 20 µg/L) fueron registradas con un límite de detección de 0,03µg/L. También se han reportado el uso de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN_x-MWNTs) los cuales han sido utilizados para formar andamiajes con NPs de oro siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, lográndose obtener una respuesta lineal para concentraciones de MC-LR entre 0,005-1 µg/L²¹. Otro tipo diferente de NPs derivadas del carbono corresponde a los nanodiamantes^{22,23}, las cuales han mostrado que cuando son inmovilizadas sobre superficies electródicas de oro o diamante dopados con boro, incrementan las señales redox de diferentes especies, características estas que las hacen excelentes candidatas para elaborar inmunosensores electroquímicos en los cuales la señal redox de la molécula reportera sufre complicaciones para ser detectada o en aquellos sistemas donde la cinética de transferencia electrónica sea lenta. Recientemente, Foord *et al.*²⁴ reportaron la determinación de L-glutamato mediante la inmovilización de glutamato oxidasa sobre superficies de diamante dopado con boro y sobre superficies de nanoplacas (del inglés *nano-platelet*) ambas modificadas con NPs de platino, estos electrodos mostraron ser más sensibles y con un desempeño muy superior cuando se compara con otros sistemas reportados en la literatura, además, los que emplearon diamante, generaron menores corrientes de fondo y mayor estabilidad en el tiempo.

Con relación a los puntos cuánticos, éstos son nanocristales o NPs inorgánicas semiconductoras cuyas propiedades especiales de electroluminiscencia los hacen excelentes candidatos para sustituir tintes y materiales fluorescentes, características estas que los catapultan como excelentes opciones para desarrollar sensores ópticos para la detección de cáncer⁷ y el desarrollo de otros tipos de inmunosensores²⁵, tal y como puede apreciarse del trabajo reportado por Su *et al.*²⁶ quienes evaluaron un inmunosensor híbrido tipo sándwich combinando NPs de óxido de hierro y puntos cuánticos de grafeno y proteínas de apoferritina incorporados como un anticuerpo secundario.

Otro grupo de NMs corresponde a los nanocables y las NPs metálicas. Los nanocables son nanoestructuras que llegan a presentar longitudes típicas de un micrómetro, éstos han sido sintetizados de metales puros (Pt, Au, Cu, Ni, Cd), óxidos metálicos (Fe, Zn, Ti), semi-

conductores (Si, InP, GaN) y aislantes (SiO₂, TiO₂). Por su parte, las NPs metálicas¹³ corresponden a partículas individuales o algunas veces a clústeres de los metales puros o, principalmente, óxido de hierro (II). En términos generales, las NPs metálicas pueden ser incorporadas a los inmunosensores electroquímicos con la finalidad de modificar la superficie electródica, modificar anticuerpos que no se enlazan directamente con la superficie electródica y como facilitadores de la transferencia de carga de manera tal de promover la generación de una señal medible en el electrodo de trabajo²⁷.

De entre las NPs metálicas, la más empleada en el campo de los inmunosensores electroquímicos son las NPs de oro y el oro coloidal, su uso no solo se debe a la facilidad de aplicación sobre los transductores (caso oro coloidal) y capacidad de generarlos experimentalmente con una distribución de tamaño estrecha, sino también porque facilita la transferencia electrónica entre la biomolécula y la superficie electródica, ofrece excelente actividades catalíticas²⁸ e interacción con un amplio espectro de proteínas, péptidos y enzimas.

El uso de NPs de oro no es novedoso en el campo de los biosensores²⁹⁻³² ya que es muy común trabajar con superficies electródicas de oro o con depósitos de oro debido a que las características químicas de este elemento (y sus micro y NPs) favorecen diferentes tipos de interacciones (electrostáticas, hidrofóbicas y enlaces covalentes) con compuestos tipo tioles, grupos aminos^{33,34} y otro conjunto importante de grupos funcionales y moléculas. Tal y como se mencionó anteriormente, las NPs de oro se pueden inmovilizar fácilmente sobre diferentes superficies electródicas tanto por impregnación (por colocación de gota o capa por capa) como por deposición potenciostática, aunque la literatura muestra algunos ejemplos en los cuales se han preparado sistemas de nanocompositos híbridos³⁵ (orgánicos-inorgánicos) como por ejemplo Fe₃O₄/Au, a partir de partículas de Fe₃O₄ modificadas con tioles³⁶, los cuales han mostrado excelente biocompatibilidad y alta estabilidad en el tiempo.

También se han empleado NPs de otros metales³⁷ en los que destacan Pt, Ag y Cu³⁸; esto se ha logrado siguiendo protocolos de deposición que van desde la aplicación de pulsos potenciostáticos a partir de soluciones diluidas hasta la modificación superficial tipo sándwich sobre superficies de grafeno, carbón vítreo, grafito y platino. Otro aspecto importante que se traslada de la experiencia de los biosensores, es que la morfología de las NPs metálicas afecta su rendimiento (estabilidad y utilidad), por lo que es de esperarse que tenga el mismo comportamiento cuando se emplea en la preparación de inmunosensores electroquímicos, ya que sus propiedades catalíticas, densidad y área específica cambian para cada tipo de morfología, tal y como se ha reportado para el caso de platino^{39,40} y para el caso de electrodos tipo FED (emisores de campo).

Por otro lado, existe otro conjunto de materiales como los polímeros conductores, iones líquidos y polielectrolitos los cuales también han sido utilizados para modificar las superficies electródicas buscando mejorar la respuesta del inmunosensor y además favorecer la incorporación de NPs creando sistemas nanoestructurados. Las NPs pueden incorporarse en una solución de estos materiales, a la superficie del transductor por aplicación directa, al aplicar potenciales adecuados para que ocurra la deposición del polielectrolito e incluso por ciclado del potencial induciendo la electropolimerización de sustancias como pirrol o anilina. También se han modificado diferentes superficies electródicas a través de la técnica

sol-gel o encapsulados en diferentes polímeros y biopolímeros. Adicionalmente, se han utilizado métodos de modificación superficial más complejos que involucran la incorporación de CNTs, los cuales han sido previamente funcionalizados en sus extremos y posteriormente modificados covalentemente con péptidos, para proceder a reconocer y capturar células sobre la superficie electródica

3.2.2. Vinculación con el transductor

Uno de los inconvenientes en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos proviene de las dificultades de obtener transferencias electrónicas directas entre el elemento biológico (por ejemplo enzimas) y la superficie electródica, dado que, por ejemplo, los centros redox se encuentran alojados a lo interno de la enzima o recubiertos de cadenas carbonadas complejas (capas proteicas) que imposibilitan o inhiben la transferencia electrónica. La mejor manera de solventar esta situación es empleando NPs o NMs como nanotubos de carbono, ya que estas, gracias a su alta conductividad y gran área superficial específica, actúan como conductores eléctricos entre la enzima (adsorbida o enlazada covalentemente al nanotubo) y el transductor.

En el inmunosensor, el transductor corresponde a la superficie electródica, de allí que el proceso de incorporación del elemento sensor a esta superficie puede realizarse de diferentes maneras. Generalmente, tanto el anticuerpo como el antígeno pueden llegar a fijarse directamente sobre las superficies metálicas (Au, Pt) o de carbono, para ello se colocan pequeñas cantidades de alguno de estos componentes biológicos en soluciones tamponadas dejándose reducir su volumen en una atmósfera de nitrógeno o argón, posteriormente se deben realizar pruebas a la superficie modificada, como por ejemplo caracterizando la respuesta de una cupla redox conocida, tipo ferrocianuro de potasio o hidroquinona, para verificar la eficiencia de la inmovilización, seguidamente se requerirá de membranas o películas poliméricas delgadas para evitar la degradación o desprendimiento de este elemento biológico de la superficie electródica; en términos generales los procesos de inmovilización directa sobre la superficie electródica tienden a ser menos estables por lo que tienden a proporcionar bajos límites de detección y son poco reproducibles. Otros procesos de incorporación del elemento sensor requieren de modificaciones previas a la superficie, así por ejemplo se han incorporado nanotubos de carbono sobre superficies de carbón vítreo por impregnación (se crea una dispersión de los nanotubos en una solución o gel polimérico) directa y sobre éstas nanoestructuras se inmovilizan covalentemente antígenos específicos para la detección de cáncer⁷ monitoreando, por ejemplo vía voltamperometría de pulso diferencial, las corrientes de oxidación de los residuos aminoácidos aromáticos (tipo tirosina y triptófano), aunque también se han reportado la incorporación de nanotubos de carbono preparando electrodos de pasta de carbón o al tenerlos dispersos en el medio al cual se le modificará la superficie mediante electropolimerización; en otros casos sobre el transductor se depositan NPs de oro a las cuales se les incorporan cadenas de diferentes tamaños de tioles y sobre estas superficies modificadas se incorpora el antígeno o anticuerpo, aunque hay estrategias que implican la modificación de transductores de oro con ditioles sobre los cuales se incorporan NPs de oro y sobre estas NPs se inmovilizan los anticuerpos formando estructura tipo sándwich, también se han aprovechado las características electrostáticas

de las NPs de oro cuando se encuentran en suspensión, adsorbiendo directamente estas partículas cargadas sobre la superficie electródica, la cual ha sido previamente modificada con materiales cargados positivamente (por ejemplo: películas de quitosano protonado) para posteriormente colocar suspensiones de NPs de oro cargadas (en citrato) o en otros casos co-depositando las NPs de oro dispersas en una solución de quitosano sobre superficies de carbón vítreo y oro⁴¹.

Tal vez el método más común de inmovilización del elemento sensor al transductor proviene de la metodología biológica denominada ELISA (figura 3.3). Bajo este proceso, en vez de emplearse pozos de poliestireno⁴² sobre los cuales se deposita el antígeno recombinante en el ELISA modificado, la inmovilización del antígeno se realiza sobre la superficie electródica y luego se procede a colocar en contacto el transductor modificado con el suero del paciente o con la solución contentiva de los anticuerpos necesarios para formar el inmunocomplejo, procediendo a confirmar la formación del mismo a través del uso de anticuerpos secundarios marcados con una enzima reportera, la cual, dada la reacción específica entre los anticuerpos, reaccionará con su sustrato y se procederá a registrar la respuesta redox por alguna técnica electroquímica (figura 3.4).

Estos sistemas requieren del uso de mediadores redox (sustancias que sufren reacciones de transferencia electrónica rápidas y simples) que faciliten el transporte de la carga desde la enzima reportera hasta la superficie electródica, tales como ferricianuro de potasio, hidroquinona, derivados de ferrocenos ácidos, etc., de que la interacción y dispersión de estos mediadores en el sistema de reconocimiento y la superficie electródica debe ser optimizada también.

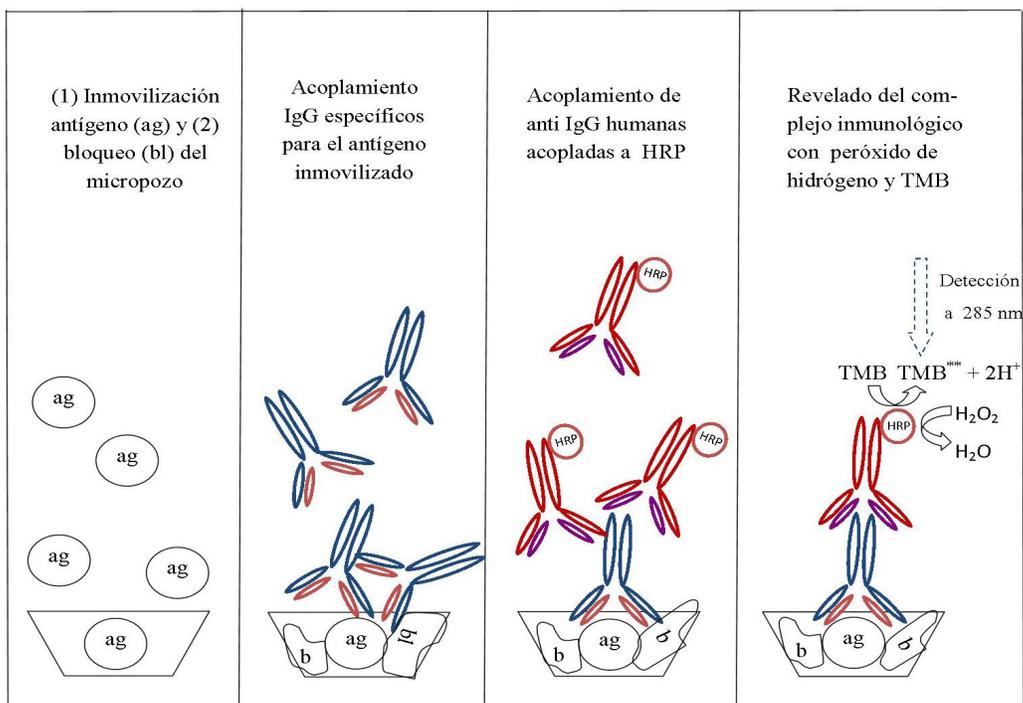


Fig. 3.3: Representación del proceso de inmunoensayos tipo ELISA.

La literatura⁴³ también muestra casos donde no se requiere marcar los componentes biológicos que actúan como reporteros de la reacción del inmunocomplejo, empleando para ello técnicas que no miden la transferencia electrónica sino efectos asociados a la resistencia del sistema (impedancia, capacitancia y medidas de conductividad) y, más recientemente, el uso de NPs magnéticas.

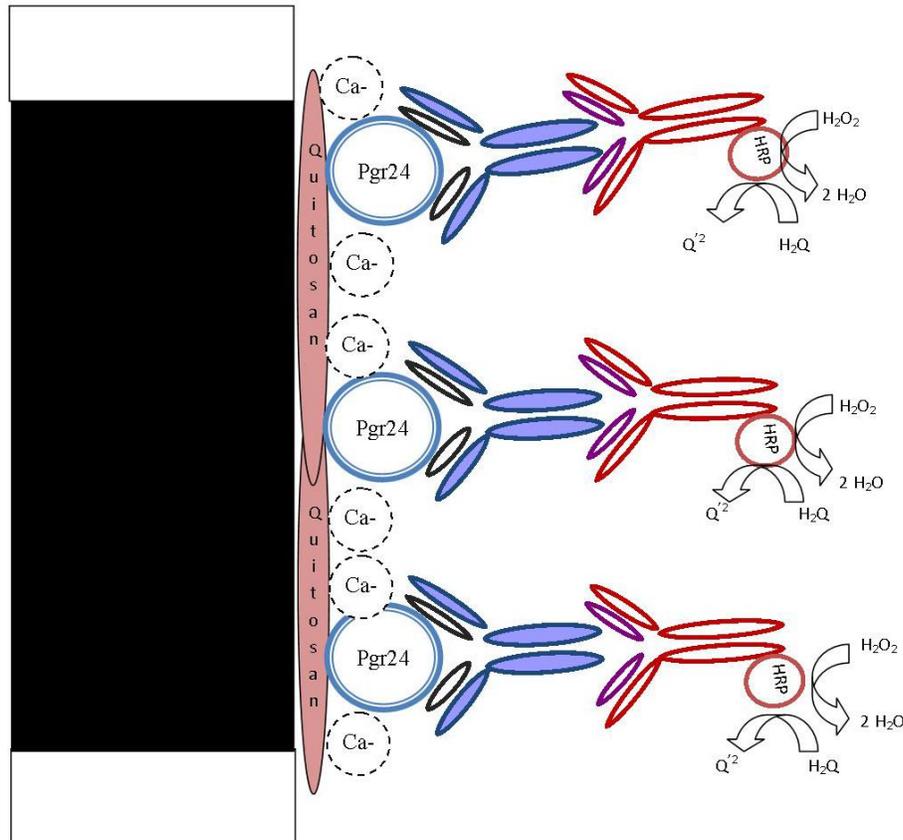


Fig. 3.4: Representación del proceso de inmunosensor electroquímico para la enfermedad de Chagas siguiendo el inmunoensayo tipo ELISA^{12,42}.

3.2.3. Comentarios sobre la reacción inmunobiológica

Como se ha definido desde un principio de este capítulo, los inmunosensores se fundamentan en la especificidad del reconocimiento molecular de los antígenos por los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig) y que son glicoproteínas, para formar un complejo estable; así, el antígeno posee zonas o regiones de interacción químicamente reconocidas por las cadenas ligeras de los anticuerpos.

Los epítopes antigénicos (resaltados en rojo) serán los responsables de interactuar con las regiones variables de los anticuerpos, las cuales se encuentran entre las cadenas polipeptídicas pesadas (representadas en gris) y las cadenas ligeras (en rojo), generando la clásica forma de “Y” de los anticuerpos. Cuando se presenta este tipo de interacción una manera de establecer la efectividad de la misma es mediante la realización de un inmunoensayo enzimático, lo cual implica que el anticuerpo se modificará incorporando

una enzima que será la responsable de reaccionar con su sustrato generando un producto cuantificable, que para el caso de los inmunosensores electroquímicos debe ser una especie electroactiva.

Existen dos tipos de anticuerpos, conocidos como monoclonales y policlonales; los del primer tipo son producidos a partir de un tipo de célula inmune y muestran una mayor sensibilidad y selectividad que los policlonales, mientras que los últimos tienen una afinidad por el antígeno diana, aunque pueden dirigirse a diferentes sitios de unión y, por consiguiente, pueden mostrar diferentes afinidades de unión.

En cuanto a la inmovilización del antígeno y del anticuerpo se lleva a cabo por dos procesos denominados como competitivos y no-competitivos; en el primero de ellos el antígeno se une al anticuerpo que ha sido inmovilizado sobre la superficie electródica, formándose una configuración tipo sándwich con otro anticuerpo marcado con una enzima, en el segundo proceso, el anticuerpo y el correspondiente antígeno (marcado con una enzima) se encuentran inmovilizados sobre la superficie electródica, así al agregar el antígeno sin marca, se genera una competencia por los anticuerpos inmovilizados en el transductor, disminuyendo la señal enzimática y permitiendo de esta manera cuantificar la cantidad de analito presente. Es por ello que para garantizar la inmovilización de estos componentes biológicos se deben tener en cuenta factores como la orientación adecuada del anticuerpo (evitando impedimentos estéricos), la fuerza iónica y pH del medio (pues se trata de interacciones débiles, electrostáticas y de van der Waals), la ausencia de especies que tiendan a inducir la agregación de los anticuerpos (se debe tratar de garantizar un exceso relativo de anticuerpos comparado a la concentración de antígenos), tiempo de incubación y aquellas consideraciones cinéticas (avidez, tipo y calidad del anticuerpo) que afecten la reacción de equilibrio de formación del inmunocomplejo.

También existe la posibilidad de detectar proteínas sin ningún tipo de marcaje (*label-free*), para lo cual el uso de NMs como los nanotubos de carbono, responsables de aportar las propiedades eléctricas y de transferencia electrónica, mecánicas y de área superficial necesaria para permitir la detección del inmunocomplejo Ab-Ag, constituye un excelente alternativa, aunque estos sistemas han funcionado mejor empleando la técnica de espectroscopia de impedancia y empleando transductores semiconductores de campo.

Otro aspecto a tener en cuenta se refiere a las dificultades que pueden presentarse cuando se trabaja con antígenos y anticuerpos, pues al ser una reacción estero-específica se requiere que la estructura tridimensional de la proteína no se vea afectada durante el proceso de inmovilización. Adicionalmente, esta reacción se debe llevar a cabo bajo condiciones tales que aseguren las propiedades fisicoquímicas de los mismos, de allí que si el reconocimiento se basa en el uso de proteínas diana, se deben evitar reacciones cruzadas (lo cual se logra al emplear antígenos genéticamente modificados) o pérdida de la actividad de la proteína, mientras que si el proceso implica la inmovilización de lisados celulares y su posterior identificación mediante el uso de anticuerpos secundarios marcados, la concentración de los componentes diana sobre la superficie electródica así como el uso de anticuerpos no selectivos, afecta la respuesta del sistema⁴⁴.

3.3. Preparación y caracterización

3.3.1. Modificaciones superficiales

El biopolímero quitosano es un excelente material para ser empleado en la modificación de superficies electródicas¹¹, ya sea por deposición capa por capa o por electrodeposición electrostática, ofreciendo una superficie porosa y estable para la formación y/o codeposición de NPs. Estas películas se forman al aplicar una solución (generalmente al 1%) ligeramente ácida de este biopolímero sobre la superficie electródica y dejando que se forme la película por simple remoción del solvente en una atmósfera de nitrógeno o aplicando potenciales catódicos no muy extremos, y que dependen del tipo de material electródico del transductor. Si, por ejemplo, se trata de carbón vítreo, el potencial no debe ser superior a los -1,4 V vs SCE, puesto que a potenciales más catódicos se favorece la reacción de evolución de hidrógeno y las películas no recubren uniformemente la superficie, generando respuestas poco reproducibles^{12,41}. También pueden crearse dispersiones de NPs en soluciones de quitosano y proceder a co-depositar ambos sobre la superficie, en este caso las soluciones deben ser frescas para tratar de evitar la generación de clúster o agregados superficiales.

También se han empleado otros materiales poliméricos sintéticos como polivinil-pirrolidona o poliestireno, en todo caso lo que se busca es realizar la síntesis de la nanopartícula en la matriz polimérica ya sea por la reducción (química o electroquímica) de la sal del metal disuelto en el medio polimérico o por evaporación del metal sobre la superficie polimérica, aunque también se han reportado el atrapamiento de NPs al realizar la polimerización *in situ*.

La literatura muestra también ejemplos en los cuales se han depositado capas de composites oro-azul de Prusia sobre superficies de carbón vítreo, sintetizados a partir de ácido cloroáurico y ferrocianuro de potasio⁴⁶, empleando voltamperometría cíclica. Otra estrategia para incorporar NPs de oro a diferentes superficies electródicas implica el uso de modificadores tipo tionina, los cuales se absorben electrostáticamente sobre la superficie; posteriormente se coloca una dispersión de NPs de oro, repitiendo este procedimiento capa por capa⁴⁷. Este proceso permite incorporar diferentes tipos de NPs metálicas o nanotubos de carbono al transductor. Una variante a este tipo de modificación implica la incorporación inicial a la superficie electródica de NPs de oro y la posterior adición de anticuerpos sobre esta superficie, ya sea por adsorción directa induciendo enlaces covalentes, por incorporación de espaciadores funcionalizados que interactúen con la NPs de oro y con algún grupo o segmento de la cadena proteica del anticuerpo, creando NPs de oro conjugadas, o mediante el uso de glico-nanopartículas (NPs de oro recubiertas con carbohidratos antigénicos), las cuales pueden interactuar directamente con células o antígenos previamente colocados sobre la superficie electródica.

También se ha reportado⁴⁸ la incorporación de NPs de plata en sílica mesoporosa (SBA-15) las cuales pueden ser luego dispersadas sobre superficies de carbón vítreo mostrando una respuesta reproducible para la detección de agua oxigenada.

Como se mencionó anteriormente, también es factible incorporar NMs mediante la dispersión de éstas en una solución contentiva del monómero adecuado (pirrol, anilina, tionina, tiofeno, etc.) con la posterior electropolimerización de éste mediante la aplicación de un pulso de potencial o ciclado de potencial. Las respuestas del inmunosensor dependerán

del espesor de la capa y el tipo de nanopartícula inmovilizada, aunque esta es una técnica realmente simple de modificación, la mayor preocupación radica en la posibilidad de desnaturalizar el anticuerpo y la consecuente pérdida de actividad⁴⁹.

3.3.2. Evaluación por técnicas electroquímicas

Cuando se inmoviliza el antígeno o el anticuerpo sobre la superficie electródica que sirve como transductor en el inmunosensor electroquímico, este proceso induce la creación de una nueva interfaz (electrodo/superficie modificada/solución) modificando las corrientes capacitivas del sistema electródico (en comparación con la superficie sin modificar). Este cambio no genera procesos faradáicos y, por lo tanto, la corriente neta del sistema se hace cero, de allí que la simple modificación pudiese ser registrada mediante experimentos de voltamperometría cíclica (como un aumento de las corrientes capacitivas) o, preferiblemente, mediante el uso de la espectroscopia de impedancia electroquímica. Estas técnicas electroquímicas permitirían caracterizar el proceso de modificación superficial pero no cuantificar la presencia de, por ejemplo, anticuerpos en la solución de suero de un paciente enfermo, de allí que se requiere incorporar una sustancia que sufra un proceso redox medible o genere una especie que sea susceptible de sufrir una reacción de transferencia electrónica, tal y como se ha mencionado en secciones previas. Así, esta sustancia electroactiva o la propia transferencia electrónica permitirían implementar otro conjunto de técnicas electroquímicas más sensibles o simples las cuales harían factible el análisis cuantitativo *in o ex situ* del analito de interés.

Así, los inmunosensores electroquímicos pueden concebirse como dispositivos diseñados para detectar las reacciones inmunoquímicas que ocurren entre un antígeno y su anticuerpo inmovilizados sobre la superficie electródica. Estos inmunosensores son específicos, muestran respuestas rápidas, son estables y pueden ser miniaturizados al emplear NMs y NPs.

Las técnicas electroquímicas más empleadas en estos dispositivos involucran aquellas en las que se perturba el potencial y se mide la corriente resultante del sistema. Se parte de sistemas en donde el transporte de la carga eléctrica se debe a movimiento de especies iónicas presentes en el medio o donde se perturba la interfaz electródica y se registran los cambios en la resistencia del sistema. A continuación se describe de forma resumida el principio y la aplicación de estas técnicas y su vinculación con los inmunosensores:

- i. Amperometría: es una técnica simple y que generalmente produce bajos límites de detección; en la cual se aplica una perturbación de potencial, generalmente como un pulso simple, a la superficie electródica desde un valor inicial bajo el cual ni la superficie del transductor ni los componentes biológicos incorporados a éste se vean afectados, hasta un potencial donde ocurra la reacción redox de interés. Esta perturbación genera una respuesta apreciada como aumento en corriente que tiende a disminuir exponencialmente (debido a que el consumo de la especie electroactiva es controlada por la difusión de la misma desde el seno de la solución a la superficie electródica). La corriente generada de esta manera puede relacionarse con la concentración tanto de antígeno o anticuerpo incorporado al inmunosensor o, en algunos casos donde se empleen enzimas reporteras, con la concentración del sustrato

(oxígeno, agua oxigenada) de la enzima, llegando a producir una especie de “escale-ra”, de la cual se obtiene la corriente límite y se relaciona con la concentración. Los inmunosensores amperométricos generalmente trabajan a potenciales anódicos, lo cual pudiese, en caso de aplicar potenciales extremos, promover la degradación de las matrices poliméricas empleadas para inmovilizar el componente biológico de interés o favorecer reacciones secundarias con los productos de la reacción de los anticuerpos marcados, tal y como es el caso cuando se emplean fosfatasas alcalinas y sus sustratos, aunque la limitante principal para este tipo de inmunosensores es la sensibilidad.

- ii. Voltamperometría: en esta técnica se aplica una perturbación de potencial de forma lineal o trigonal a la superficie electródica en función del tiempo, registrándose la respuesta en corriente en función del potencial aplicado (y bajo una determinada velocidad de barrido). Esta técnica es empleada tanto para la cuantificación (al relacionar la corriente pico o máximo de corriente con la concentración de la especie electroactiva) de las especies redox de interés como para la caracterización, seguimiento y optimización del proceso de modificación del transductor ya que permite monitorizar los procesos de adsorción superficial, caracterizar el proceso de transferencia electrónica debida a las NPs incorporadas al transductor y estudiar la estabilidad de los inmunosensores en el tiempo. Las respuestas que se producen en esta técnica se aprecian como hombros, picos o plató, de los cuales una persona entrenada puede obtener información fisicoquímica y mecánica sobre el proceso redox que se lleva a cabo en el inmunosensor. Bajo el término voltamperometría se encuentran métodos lineales, cíclicos, rotatorios, de pulso diferencial, onda cuadrada, alterna y de despojo. Los métodos lineales y cíclicos se emplean para caracterizar las superficies electródicas (transductor), realizar seguimiento del proceso de deposición de NPs o NMs, ya sea al registrar la respuesta de cada etapa de modificación en un medio electrolítico o empleando una sustancia sonda (sustancia electroactiva tipo hidroquinona de respuesta conocida), o evaluar el proceso de incorporación de antígenos o anticuerpos en el armado o construcción del inmunosensor. Las técnicas de pulso (diferencial, despojo u onda cuadrada) se emplean en aquellas situaciones donde se requieran determinar bajas concentraciones del analito (del orden de 10^{-7} M o inferiores), disminuir las corrientes de fondo y mejorar la relación señal/ruido del método de detección. En estos métodos la perturbación de la superficie electródica sigue siendo una variación lineal del potencial en función del tiempo, aunque para disminuir las contribuciones de las corrientes de fondo (capacitivas) sobre una determinada rampa de potencial se superponen pulsos y se modifica el tiempo en el cual se mide la corriente generando una respuesta de la diferencia de la corriente versus el potencial. El método de onda cuadrada es el más sensible y generalmente se emplea en inmunosensores electroquímicos dedicados a la determinación de biomarcadores cancerígenos (dado su bajo límite de detección y rapidez en la medida).
- iii. Conductimetría: en esta técnica se detectan los cambios que se producen en la conductividad eléctrica (o conductancia) de la solución debido a cambios en su composición producto de la inmuno-reacción a potencial constante, la cual, en el caso que el transductor haya sido modificado con NMs (por ejemplo nanotubos) es potenciada debido a la mayor área superficial efectiva y su baja reactividad química,

- pudiendo estos NMs llegar a simular canales iónicos moleculares (como en las membranas lipídicas) facilitando la medida. En el caso de los inmunosensores tipo sándwich^{50,51} y marcados con una enzimas, se registran los cambios en la conductividad debido a las sustancias cargadas que se generan como producto de la reacción enzima-sustrato, los cuales inducen microcambios en la fuerza iónica del medio y, por ende, en la conductividad final de la solución. Este método es simple, fácil de miniaturizar y adaptable a las nuevas técnicas de fabricación de electrodos y micromaquinado; sin embargo se debe controlar muy bien el diseño de la celda para garantizar la disposición correcta de los electrodos. La literatura muestra que este tipo de inmunosensores han sido utilizados en la detección de toxinas y patógenos en alimentos⁷.
- iv. Potenciometría: es una técnica simple fundamentada en la medición de la diferencia de potencial que se genera entre dos electrodos, uno indicador y otro de referencia (cuyo valor de potencial es fijo y conocido) cuando el sistema se encuentra en equilibrio. Este se rige por la clásica ecuación de Nernst por lo que requiere que no fluya corriente neta por el sistema. Bajo estas condiciones un inmunosensor potenciométrico puede ser de membrana, en el cual se determina el potencial generado por intercambio o acumulación de carga eléctrica entre el sensor y la membrana, de allí que la inmuno-reacción Ag-Ab (uno de ellos inmovilizado en la membrana) modificará el potencial, pudiéndose registrar el cambio de potencial versus el logaritmo de la concentración de reactante; también puede generarse modificando la superficie del transductor con NPs o películas contentivas de éstas y determinando los cambios de potencial al ocurrir el reconocimiento molecular o al modificarse la concentración de las especies en la solución involucradas en el equilibrio químico que se lleva a cabo; o puede emplear los semiconductores de campo (tipo FET) monitorizando los cambios en la carga superficial electródica^{52,53}. Recientemente, Kim *et al.*⁵⁴ reportaron una revisión sobre el uso de electrodos basados en transistores selectivos a iones de efecto de campo (del inglés ISFET) aplicados al área de los biosensores. Éstos se componen de tres terminales conocidos como fuente, drenaje y puerta; en ellos el voltaje entre la fuente y el drenaje regula el flujo de corriente en el voltaje de la puerta. Cuando estos electrodos permiten que los iones interactúen con una parte del sensor denominado “puerta”, adsorbiéndose sobre el aislante, tienden a generar un cambio en la conductividad del transistor, la cual es proporcional a la cantidad de iones adsorbidos, de allí que al modificar la “puerta” con receptores moleculares o membranas selectivas a iones, se pueden desarrollar biosensores para ADN, colesterol, inmuno-ISFET modificados con NPs de oro y en los cuales los cambios de la reacción inmunoquímica se monitorizó a través de cambios en el pH.
 - v. Impedancia: esta técnica permite cuantificar los procesos de adsorción superficial a través de los cambios en la capacitancia y resistencia de la interfaz electródica cuando se aplica una perturbación sinusoidal del potencial de frecuencia variable sobre el sistema en equilibrio; a partir de las mediciones de desfase y de amplitud de la respuesta, es posible obtener la impedancia (Z^*) de transferencia electroquímica del material estudiado; así, la corriente resultante tendrá la misma frecuencia que el potencial aplicado pero diferente fase. Existen varios reportes dedicados al desarrollo

de inmunosensores impedimétricos debido a su alta sensibilidad para la detección de proteínas libres de marcaje, adicionalmente la incorporación de NPs y nanomateriales mejora la conductividad eléctrica de la interfaz electródica. Mediante estas medidas es posible evaluar los cambios en la resistencia a medida que los anticuerpos se van inmovilizando sobre la superficie electródica, así como también caracterizar los procesos fisicoquímicos y de transferencia electrónica que ocurren sobre el transductor, procediendo a relacionar los cambios de la impedancia con la concentración del biomarcador en la muestra. Esta técnica ha permitido el desarrollo de inmunosensores en los cuales se han incorporado nanotubos de carbono sobre semiconductores de campo (FET) para la determinación de Ig E, llegando a límites de detección de hasta 250 pM de esta proteína⁵⁵. La principal desventaja de la impedancia aplicada a los inmunosensores radica en el tiempo que tarda la regeneración de la superficie electródica una vez modificada la misma.

3.4. Aplicaciones

3.4.1. Ciencias de la salud

Gran parte de la investigación mostrada en la literatura científica durante la pasada década ha sido dirigida al desarrollo de inmunosensores electroquímicos para el área de atención clínica, en especial aplicaciones hacia biomarcadores tumorales y, dentro de éstos, se ha prestado gran atención a los antígenos prostáticos, posiblemente dada la alta incidencia de este tipo de cáncer y las limitaciones/confianza en los sistemas de detección temprana existentes. El antígeno prostático puede ser determinado en suero sanguíneo ya que éste se encuentra en forma natural en ese medio, sin embargo, en el caso de la aparición de tumores cancerígenos en la próstata, la concentración de estos antígenos tiende a aumentar en el torrente sanguíneo de manera considerable. Estudios recientes reportados por la Asociación Americana del Cáncer sugieren que niveles mayores del antígeno prostático específico (APE) a los 2,5 ng/mL en sangre en pacientes masculinos mayores de 50 años deberían inducir a la toma de una biopsia, mientras que para pacientes menores a los 50 años se pueden aceptar niveles inferiores a los 4 ng/mL.

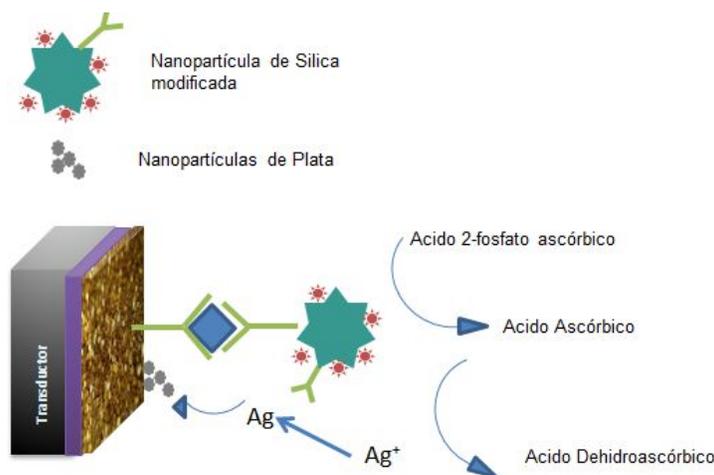


Fig. 3.5: Representación del inmunosensor electroquímico de APE (♦) con NPs de sílice modificadas con fosfatasa alcalina y anti-APE y su funcionamiento con el sustrato de la fosfatasa alcalina. Adaptada de Lai *et al.*⁵⁶.

Debido a estos niveles de concentración tan bajos, así como de la necesidad de disponer de ensayos específicos, rápidos, de bajo costo y portátiles, es que los inmunosensores han llamado la atención de diversos investigadores y grupos de investigación en esta área. Así por ejemplo, un trabajo interesante por el tipo de NPs empleadas así como del proceso de modificación superficial tipo sándwich sobre el transductor, es el reportado por Chu *et al.*⁵⁶, quienes funcionalizaron anticuerpos anti-APE con NPs de sílica modificadas con fosfatasa alcalina (vía entrecruzamiento empleando diimidias), como inductora electroquímica para la reducción de iones plata, los cuales actúan como amplificador de la señal electroquímica, dada la ausencia de mediadores en el sistema (figura 3.5), reportando de manera indirecta la presencia de la APE por la respuesta voltamperométrica correspondiente al despojo del metal depositado. Este sensor requirió de la modificación inicial del transductor de oro con un anti-APE para formar el sistema tipo sándwich; aunque el procedimiento de activación de la superficie electródica luce un poco complejo, los autores reportan una buena estabilidad del inmunosensor y resultados comparables a los obtenidos por inmunoensayos por quimioluminiscencia, aunque la desviación estándar reportada es baja, no se proporciona información sobre la validación de la metodología planteada.

Una estrategia similar (electrodo tipo sándwich), pero con mejores resultados, fueron obtenidos por Yan *et al.*⁵⁷, quienes emplearon agregaciones de NPs de plata sobre nanotubos de carbono carboxilados formando nanohíbridos funcionalizados, los cuales se hicieron interactuar con la proteína estreptavidina y el anticuerpo adecuado (biotina anti-ACE). Este sistema nanoestructurado se puso en contacto con electrodos serigrafados de grafito previamente modificados con películas de quitosano y que poseían ya inmovilizados anticuerpos anti-ACE y el ACE, formando de esta manera el inmunocomplejo y determinando la presencia del mismo a través de la señal voltamperométrica anódica de despojo de la plata. Este inmunosensor electroquímico mostró una respuesta lineal a concentraciones de 0,1 pg/mL a 5 ng/mL y límites de detección del orden de los pg/mL.

Recientemente Zheng *et al.*⁵⁸ reportaron la preparación de un inmunosensor electro-químico tipo sándwich para la determinación de células cancerígenas en sangre, lo novedoso de este inmunosensor no es la inmovilización de antígeno carcino-embriionario (ACE), una proteína presente en tumores (cáncer de colon) y en el tejido de fetos en el útero, sino la presencia simultánea de marcadores enzimáticos y de mediadores electrónicos basados en NPs de capa externa. La estrategia de modificación superficial implicó la formación de una película de quitosano por impregnación simple de una superficie de carbón vítreo (transductor), esta superficie posteriormente fue modificada con NPs de oro (depositadas por un pulso de potencial) las cuales fueron estabilizadas por ciclado en medio básico, posteriormente a este electrodo se le incorporaron anticuerpos anti-ACE, el antígeno ACE (para formar la modificación tipo sándwich, figura 3.6) y finalmente anticuerpos anti-ACE marcados con peroxidasa de rábano modificados con NPs de ADN/Fe₃O₄/ZrO₂. Este inmunosensor genera una respuesta voltamperométrica catódica con un rango dinámico lineal (0,008-200 mg/mL de ACE) muy superior a otros inmunosensores tipo sándwich, además los autores indican que el método para determinar ACE en suero humano es 100 veces más sensible que el correspondiente procedimiento de ELISA. Otros investigadores han empleado la misma estrategia con NPs de sílica funcionalizados con derivados

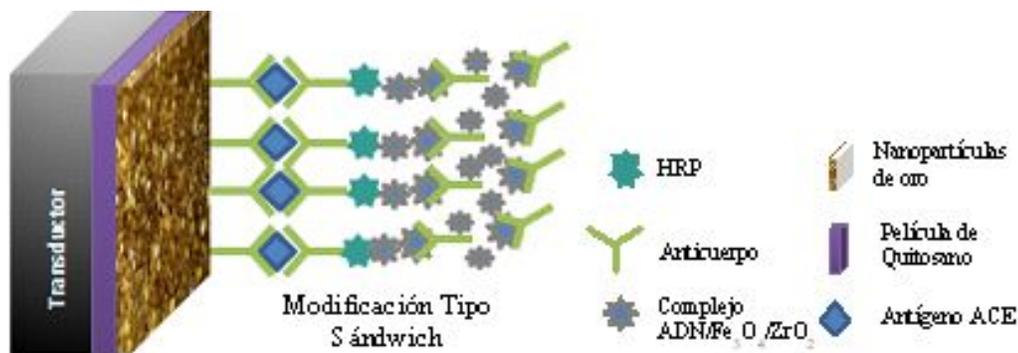


Fig. 3.6: Representación de un inmunosensor electroquímico tipo sándwich. Adaptada del sistema descrito por Gan *et al.*⁵⁷.

bipiridínicos de rutenio (III) encontrando límites de detección del orden de los ng/mL (pM)⁵⁹.

Una aproximación diferente fue propuesta por Patel *et al.*⁶⁰, la cual implica utilizar nanotubos de carbono de pared simple, bioconjugados como andamiajes para la inmovilización de células o componentes biológicos de interés, de allí que se han reportado sistemas de este tipo en los cuales se ha inmovilizado antígeno prostático, llegando a obtenerse límites de detección del orden de los 4 pg/mL para este antígeno. En otros casos, se ha logrado estructurar sistemas complejos por incorporación de una secuencia de aminoácidos en nanotubos de carbono multiparedes que permiten inmovilizar directamente células^{61,62} (por ejemplo células cancerígenas)⁶³, este tipo de modificación permite servir de estructura de soporte para que ocurra la fijación de las células y, a su vez, actúe como nanosonda de reconocimiento, transducción y para la amplificación de la señal del inmunosensor.

En la búsqueda por obtener inmunosensores más sensibles y específicos para la determinación de biomarcadores cancerígenos, algunos investigadores han desarrollado diferentes métodos para determinar alfa-fetoproteínas (AFP), siendo el principal inconveniente sus bajas concentraciones en suero sanguíneo (inferiores a 20 ng/mL). Por ello se han evaluado diferentes estrategias (como las mencionadas en este capítulo) para desarrollar inmunosensores electroquímicos para tal fin, inclusive empleando NPs. Un sistema interesante implica el uso de materiales híbridos, tal y como lo reporta Gan *et al.*⁶⁴, quienes emplearon NPs magnéticas de Fe₃O₄ y Au. Bajo este sistema, el primer componente aporta la capacidad de separar, aislar y purificar muestras biológicas, una vez que estas NPs han sido unidas al componente biológico por la aplicación de un campo magnético, mientras que las NPs de oro aportan mayor área efectiva para promover la inmovilización física de la muestra, facilitan la transferencia electrónica y mantienen la biocompatibilidad del complejo. Bajo ese concepto estos investigadores modificaron las partículas de óxido de hierro con (3-mecaptopropil)-trimetoxisilano de manera de crear el material híbrido con las NPs de oro (gracias a la interacción SH-Au), el cual fue nuevamente modificado incorporando anticuerpos secundarios marcados con HRP. Este bioconjugado se puso en contacto con un electrodo de carbón vítreo, el cual fue previamente modificado con NPs de oro y anti-AFP (tipo sándwich); la respuesta del

inmunosensor a diferentes concentraciones del AFP fue registrada empleando hidroquinona como mediador, obteniendo un intervalo dinámico lineal entre 0,005-10 ng/mL y límites de detección del orden de 3 pg/mL. En este trabajo resalta el proceso de regeneración del inmunosensor (etapa crítica de estos sistemas y donde la mayoría falla), ya que esto se logra al aplicar un campo magnético externo, reteniendo cerca del 90% de la corriente inicial después de 18 procesos de regeneración.

En cuanto a sistemas de inmovilización directa, la investigación de Arora *et al.*⁶⁵ muestra una metodología interesante para desarrollar inmunosensores electroquímicos para marcadores de cáncer de pulmón. En este trabajo se modificó un electrodo de ITO (óxido de indio-estaño) con óxido de grafeno por el método de “*spin coating*”, este electrodo fue expuesto a anticuerpos policlonales de telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) para enlazarlos covalentemente con los grupos funcionales presentes en el óxido de grafeno y posteriormente expuestos a soluciones de hTERT y esputos de pacientes; los procesos de ensamblaje y la respuesta de los inmunosensores fueron evaluados por técnicas voltamperométricas y espectroscópicas (FTIR), los mismos mostraron rangos dinámicos lineales realmente bajos (100 fg/mL a 50 ng/mL), y los autores indican que el electrodo mantiene su actividad luego de ser empleado varias veces, aunque no muestran evidencia de dicho proceso. Otros investigadores⁶⁶ han incorporado NPs de oro coloidal con anticuerpos monoclonales (antígenos de cáncer 15-3, 125, 19-9 y carcino-embionario) marcados con peroxidasa de rábano (HRP) en electrodos de grafito serigrafiado; el proceso de inmovilización requirió del uso de un gel de quitosano para garantizar la estabilidad de la capa sensora donde se formará el inmunocomplejo una vez incubado el suero del paciente. Las respuestas fueron monitorizadas por voltamperometría de pulso diferencial a través de la reacción de la transferencia electrónica proveniente de la HRP para cada analito, obteniendo respuestas analíticas reproducibles y con buena precisión.

Un trabajo interesante sobre la determinación de pesticidas y agentes químicos en plasma es el reportado por Lin *et al.*⁶⁷; estos investigadores desarrollaron inmunosensores electroquímicos desechables modificando electrodos serigrafiados con NPs de ZrO₂ y reportaron límites de detección del orden de 0,03 nM empleando voltamperometría de despojo como técnica de medición.

3.4.2 Medio ambiente

Existe un conjunto de trabajos de investigación relacionados con la detección de pesticidas (atrazina y sus derivados) empleando inmunosensores electroquímicos, ya sea a través de medidas amperométricas, al emplear marcadores enzimáticos, o sin marcaje, mediante inmunosensores basados en medidas de impedancia⁶⁸. Cosnier *et al.*⁶⁹ reportaron la detección de atrazina mediante electrodos impedimétricos (modificando la superficie de oro con películas electro-generadas de polipirrol modificadas) llegando a límites de detección del orden de los 10 pg/mL. También Piro *et al.*⁶⁸ reportaron un sensor voltamperométrico (onda cuadrada) para este pesticida, llegando a obtener límites de detección del orden de 1 pM.

Otros pesticidas importantes como los organofosforados, carbamatos y glifosatos han sido estudiados a través del desarrollo de inmunosensores electroquímicos, evaluando la

inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE); ejemplos con sus respectivos límites de detección, tipo de inmovilización y material electroactivo son reportados en el artículo de revisión de Sassolas *et al.*⁷⁰, quienes presentan un amplio espectro de técnicas, procesos y condiciones para entender las nuevas tendencias en los biosensores para la detección de pesticidas. Otras estrategias han incorporado partículas magnéticas (magneto-ELISA) a inmunoensayos para la determinación de atrazina y sulfometazina, así como antibióticos en leche y muestras de aguas^{71,72}.

Algunos trabajos sobre el uso de biosensores e inmunosensores para evaluar la calidad de aguas muestran estudios interesantes como el reportado por Lin *et al.*, quienes modificaron electrodos serigrafiados de grafito con películas de un derivado del tiofeno y nanotubos de carbono para la determinación de nitritos en muestras de agua⁷³. Igualmente, se han empleado electrodos de carbón vítreo modificados con grafeno y quitosano en la determinación de toxinas en muestras de agua de consumo humano⁷⁴, en particular microcistina-LR, la cual fue identificada a través de anticuerpos Anti-MC-LR marcados con nanoesferas de carbono y HRP; este trabajo muestra una muy buena metodología analítica (ensayos de interferentes, análisis de muestras reales, análisis de reproducibilidad) y bajos límites de detección. Un buen resumen sobre este tema se obtiene del trabajo de Bojorme *et al.*⁷⁵, quienes muestran un conjunto de información técnica y con características analíticas importantes.

Otros contaminantes importantes determinados en muestras de agua a través de inmunosensores amperométricos han sido los hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo benzopirenos), usando electrodos de oro modificados con monocapas auto-ensambladas (SAM) a los cuales se les incorporan anticuerpos siguiendo el esquema ELISA^{76,77}. Este mismo procedimiento con anticuerpos monoclonales, pero analizando las respuestas de los electrodos por la técnica de impedancia, ha sido reportado por Liu *et al.*⁷⁸. Estos investigadores evaluaron los dos sistemas, inmovilizando el antígeno o el anticuerpo sobre la superficie del transductor, estudiando conjugados de BSA con pireno y benzopireno. También se ha reportado la determinación de este tipo de hidrocarburos a través de voltametría cíclica, evaluando la cinética de la sonda ferro/ferricianuro sobre electrodos de oro modificados con SAM, llegando a obtener respuestas lineales de la concentración del anticuerpo entre 2 y 96 ppm (típica para este tipo de técnica), aunque Liu *et al.* reportaron que cuando se emplea pirrolquinolinquinona como sonda redox sobre electrodo de oro modificados con SAM, el rango de concentraciones disminuye a 5 - 1000 μM . También existen reportes sobre la determinación de derivados del fenantreno empleando inmunosensores amperométricos preparados a partir de electrodos de grafito serigrafiados modificados con anticuerpos monoclonales marcados con fosfatasa alcalina⁷⁷. Estos electrodos mostraron respuestas lineales entre 5 a 45 ng/mL y en este trabajo se estudiaron, adicionalmente, los efectos de diferentes solventes orgánicos, hidrocarburos poliaromáticos y muestras de ríos sobre la respuesta del inmunosensor, encontrándose que esta metodología ofrece una vía adecuada para el desarrollo de sensores para calidad de aguas.

3.4.3. Otras aplicaciones

En el control de calidad e identificación de contaminantes en alimentos los bio-sensores

juegan un rol preponderante; sin embargo, existen algunos ejemplos sobre el uso de inmuno-sensores electroquímicos, como el uso de un magneto-inmuno-sensor electroquímico para bifenilos policlorados (PCB) en muestras de leche⁷⁹. En este estudio se evaluaron las respuestas de dos anticuerpos, anti-PCB28 y anti-PCB77. El transductor, una superficie de grafito serigrafiado de baja densidad, fue modificado con partículas magnéticas acopladas a proteína G; la superficie modificada fue incubada con anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina inmovilizando los dos anticuerpos (de manera competitiva) y evaluando la respuesta en presencia de naftil-fosfato como sustrato, aunque debido a lo complejo de la matriz (muestras de leche) esta técnica se acopló a un sistema de extracción sólida, logrando determinar concentraciones de PCB del orden de los ppb. Otras investigaciones han sido dirigidas a la determinación de mico-toxinas en alimentos, así Tohill *et al.*⁸⁰ reportaron la detección de fumonisinas mediante el uso de electrodos serigrafiados de oro modificados por la metodología ELISA competitiva (discutida en secciones anteriores), incorporando anticuerpos anti-IgG y exponiendo anticuerpos anti-fumonisininas marcados con HRP y fumonisinas libres a la superficie eléctrica, empleando TMB como mediador electroquímico y agua oxigenada como sustrato de la HRP, obteniendo rangos lineales de respuesta en concentración entre 10 – 1000 µg/L y límite de detección de 10 µg/L. Existen otros reportes sobre el desarrollo de inmuno-sensores electroquímicos para la determinación de gliadina⁸¹ (componente del gluten y vinculada a la enfermedad celíaca) en alimentos empleando superficies de oro modificadas con capas autoensambladas y siguiendo la metodología tipo sándwich; las superficies fueron modificadas con anticuerpos monoclonales antigliadina y policlonales antigliadina de conejo, revelando la señal con anticuerpos secundarios marcados con fosfatasa alcalina. Los resultados de la voltamperometría de pulso diferencial mostraron límites de detección del orden de los 5,5 ng/mL y resultados muy similares a los obtenidos por los ensayos clásicos de ELISA cuando se analizaron muestras de comida comercial, libre y con gluten. Las técnicas voltamperométricas unidas a impedancia electroquímica también han sido utilizadas para la detección de carbamatos (pesticida carbofurano) en muestras de repollo y lechuga empleando inmuno-sensores electroquímicos preparados por la metodología ELISA. Wang *et al.*⁸² modificaron superficies de carbón vítreo inmovilizando anticuerpos monoclonales anti-carbofurano a través de la técnica sílica-sol-gel; dado que esta capa bloquea la superficie se realizaron análisis por impedancia, empleando esta técnica para obtener rangos lineales de concentración de 1 ng/mL a 100 µg/mL con límites de detección de 0,33 ng/mL para este analito. Adicionalmente, el análisis de muestras reales confirmó la selectividad, exactitud y reproducibilidad de los resultados. Una interesante revisión sobre el uso de inmuno-sensores electroquímicos en análisis de alimentos ha sido reportada por Shastry⁸³, recomendándose su lectura.

3.5. Situación futura: dificultades y retos

Como se ha venido tratando a lo largo de este capítulo, existen muchas necesidades y retos que requieren de nuestra atención a nivel cualitativo y cuantitativo; desde el punto de vista de la preparación de las NPs es necesario disponer de nuevos métodos de síntesis y caracterización más directa, tanto de la distribución de los tamaños de partículas como de la presencia de agregados que pudiesen competir y perturbar los procesos de transferencia electrónica. En estos casos es necesario explorar el uso de

surfactantes o de matrices poliméricas ordenadas o estructuras supramoleculares que favorezcan e induzcan arreglos de NPs especiales. En el caso de los multiarreglos se han intentado organizar espacialmente la distribución de los nanoclústeres o NMs para minimizar la difusión de los mediadores o subproductos de la reacción redox que se efectúa en los electrodos vecinos, afectando la transferencia electrónica, por lo que se deben desarrollar nuevos materiales poliméricos o membranas que eviten esta situación, aunque gran parte del problema requiere de un poco de diseño industrial al momento de la preparación de los electrodos tipo “array”. Es necesario involucrar a físicoquímicos teóricos para revisar y desarrollar las ecuaciones y/o simulaciones que permitan entender los procesos de nucleación y crecimiento asociados a la generación de NMs, la formación de clúster y el desarrollo de nuevos NMs híbridos, aunado a la necesidad de establecer alianzas estratégicas con las instituciones y centros de investigación en ingeniería genética que permita tener acceso a anticuerpos, antígenos, enzimas, biomarcadores, etc., que conduzcan al desarrollo de nuevos sensores.

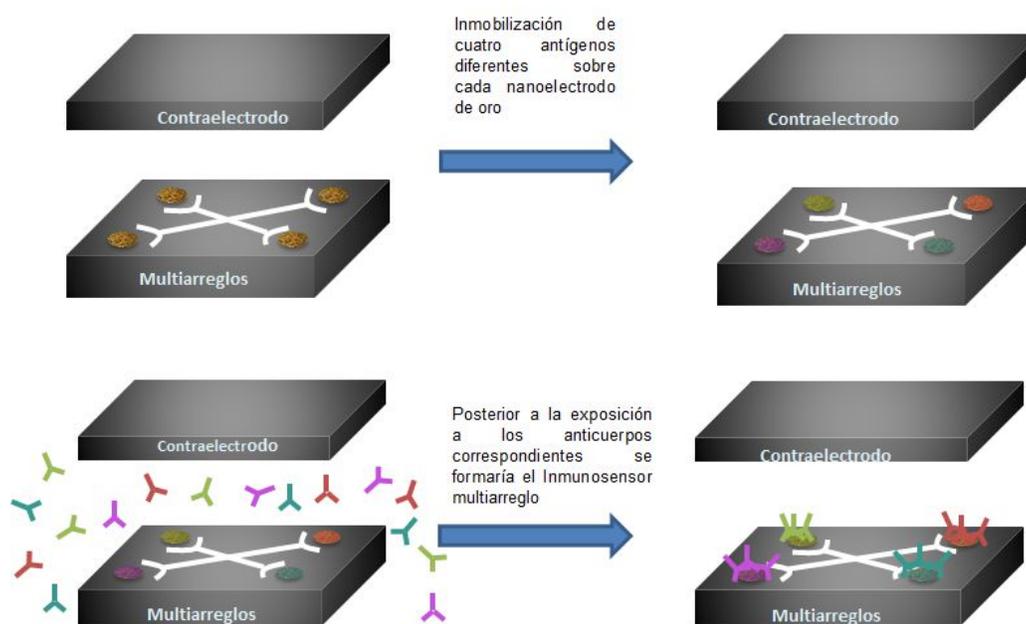


Fig. 3.7: Representación de un inmunosensor multiarreglo: (superior izquierda) multielectrodos de NPs de oro previos a la modificación, (superior derecha) multielectrodos de NPs de oro modificados con antígenos diferentes, (inferior izquierda) multielectrodos modificados y expuestos a diferentes anticuerpos, (inferior derecha) inmunosensor multiarreglo.

En cuanto a los nuevos retos, se requiere mayor investigación en sistemas de multi-análisis que incorporen un conjunto de arreglos de varios electrodos en un mismo dispositivo, los cuales pasen a convertirse en inmunosensores individuales, sólo que cada uno de los electrodos se encontrará modificado con un receptor biológico diferente, ya sea una proteína específica o un biomarcador diferente en cada elemento sensor⁸⁴, tal y como se muestra en la figura 3.7. Así, por ejemplo, se pudiesen modificar NPs de oro con diferentes antígenos o elementos de reconocimiento⁸⁴, permitiendo evaluar simultá-

neamente múltiples analitos en una misma muestra, ser incorporados a sistemas en flujo e inclusive desarrollar detectores inmuno-electroquímicos que pudiesen ser acoplados a técnicas convencionales de cuantificación, aunque el reto más claro es lograr el desarrollo de sensores cada vez más pequeños, robustos y confiables.

Finalmente, es necesario que los lectores entiendan que este es un proceso continuo de aprendizaje y de desarrollo transdisciplinario de nuevos conocimientos en esta área tan importante, por lo que este capítulo es sólo una entrada a este mundo tan interesante y con tantas aplicaciones. En ese sentido, se recomienda consultar algunos de los trabajos disponibles ^{8,59,85-88}.

Referencias

1. BR Eggins. Chemical sensors and biosensors. John Wiley & Sons, LTD. England (2002).
2. S Singh. Sensors: An effective approach for the detection of explosives. **J. Hazar. Mater.**, **144 (1-2)**, 15-28 (2007).
3. JC Bart, LL Judd, KE Hoffman, AM Wilkins, AW Kusterbeck. Application of a portable immunosensor to detect the explosives TNT and RDX in groundwater samples. **Environ. Sci. Technol.**, **31(5)**, 1505–1511 (1997).
4. JS Caygill, F Davis, SPJ Higson. Current trends in explosive detection techniques. **Talanta**, **88**, 14–29 (2012).
5. B Bohunicky, SA Mousa. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotech. Sci. Applicat.** **4**, 1–10 (2011).
6. J Wu, F Yan, X Zhang, Y Yan, J Tang, H Ju. Disposable Reagentless Electrochemical Immunosensor Array Based on a Biopolymer/Sol-Gel Membrane for Simultaneous Measurement of Several Tumor Markers. **Clinical Chemistry**, **54(9)**, 1481–1488 (2008).
7. NJ Ronkainen, SL Okon. Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Clinically Significant Biomarkers. **Materials**, **7**, 4669-4709 (2014).
8. G Liu, Y Lin. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. **Talanta**, **74**, 308–317 (2007).
9. A Warsinke, A Benkert, FW Scheller. Electrochemical immunoassay. **Fresenius J. Anal. Chem.**, **366**, 622-634 (2000).
10. K Sun, N Ramgir, S Bhansali. An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement. **Sensors and Actuators**, **B133**, 533–537 (2008).
11. AL Gindilies. Apparatus for immunological detection of preferential antigen, antibody or hapten. Patent: US 6344333 B2
12. A Maiz. Estudio electroquímico de una proteína antigénica recombinante de *Trypanosoma cruzi*, relacionada con el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Tesis de Pregrado. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Mérida, Venezuela (2012).
13. VV Mody, R Siwale, A Singh, HR Mody. Introduction to metallic nanoparticles. **J Pharm. Bioallied. Sci.**, **2(4)**, 282–289 (2010).
14. M Pumera. Nanomaterials for Electrochemical sensing and Biosensing. CRC Press (2013).
15. J Wang, G Liu, MR Jan. Ultrasensitive Electrical Biosensing of Proteins and DNA: Carbon-Nanotube Derived Amplification of the Recognition and Transduction Events. **J. Am. Chem. Soc.**, **126**, 3010–3011 (2004).

16. Y Lin, F Lu, Y Tu, Z Ren. Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles. **Nano Lett.** **4**, 191–195 (2004).
17. N Sato, H Okuma. Development of single-wall carbon nanotubes modified screen-printed electrode using a ferrocene-modified cationic surfactant for amperometric glucose biosensor applications. **Sens. Actuat. B Chem.**, **129**, 188–194 (2008).
18. JP Kim, BY Lee, S Hong, SJ Sim. Ultrasensitive carbon nanotube-based biosensors using antibody-binding fragments. **Anal. Biochem.**, **381**, 193–198 (2008).
19. M Yudasaka, S Iijima, VH Crespi. Single-wall carbon nanohorns and nanocones. **Topics Appl. Physics.**, **111**, 605–629 (2008).
20. J Zhang, J Lei, C Xu, L Ding, H Ju. Carbon nanohorn sensitized electrochemical immunosensor for rapid detection of microcystin-LR. **Anal. Chem.**, **82**, 1117–1122 (2010).
21. J Zhang, J Lei, R Pan, C Leng, Z Hu, H Ju. *In situ* assembly of gold nanoparticles on nitrogen-doped carbon nanotubes for sensitive immunosensing of microcystin-LR. **Chem. Commun.**, **47**, 668–670 (2011).
22. KB Holt, DJ Caruana, EJ Millán-Barrios. Electrochemistry of Undoped Diamond Nanoparticles: Accessing Surface Redox States. **J. Am. Chem. Soc.**, **139**, 11272–11273 (2009).
23. KB Holt, C Ziegler, DJ Caruana, J Zang, EJ Millán-Barrios, J Hud, JS Foord. Redox properties of undoped 5 nm diamond nanoparticles. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, **10**, 303–310 (2008).
24. J Hu, S Wisetsuwannaphum, JS Foord. Glutamate biosensors based on diamond and graphene platforms. **Faraday Discuss.**, **172**, 457–472 (2014).
25. L Krejcova, L Nejdil, D Hynek, S Krizkova, P Kopel, V Adam, R Kizek. Beads-Based Electrochemical Assay for the Detection of Influenza Hemagglutinin Labeled with CdTe Quantum Dots. **Molecules**, **18**, 15573–15586 (2013).
26. J Xindong Wang, L Chen, X Sun, S Ain. Electrochemical immunosensor with graphene quantum dots and apoferritin-encapsulated Cu nanoparticles double-assisted signal amplification for detection of avian leukosis virus subgroup. **Biosens. Bioelect.**, **47**, 171–177 (2013).
27. BGD Haggett. Gold and silver nanoparticles for Electrochemical Immunosensors. En: *Electrochemical Biosensors*. S. Cosnier (Ed.). Pan Stanford Publishing. CRC Press. FL-USA. (2013).
28. Y Lia, HJ Schluessenerb, S Xua. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bull.**, **43**, 29–41 (2010).
29. W Putzbach, NJ Ronkainen. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, **13**, 4811–4840 (2013).
30. J Conde, JT Dias, V Grazú, M Moros, PV Baptista, JM de la Fuente. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Front. Chem.**, **2**, 48 (2014).
31. R Lévy, TK Nguyen, RC Doty, I Hussain, RJ Nichols, DJ Schiffrin, M Brust, DG Fernig. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, **126**, 10076–10084 (2004).
32. RA Sperling, WJ Parak. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Phil. Trans. R. Soc. A.**, **368**, 1333–1383 (2010).
33. Z Zhong, S Patskovsky, P Bouvrette, JHT Luong, A Gedanken. The surface chemistry of Au colloids and their interactions with functional amino acids. **J. Phys. Chem. B.**, **108**, 4046–4052 (2004).
34. A Majzik, L Fülöp, E Csapó, F Bogár, T Martinek, B Penke, G Bíró, I Dékány. Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, β -amyloid peptides and fragment. **Coll. Surf. B.**, **81**, 235–241 (2010).

-
35. Q Li, L Zeng, J Wang, D Tang, B Liu, G Chen, M Wei. Magnetic Mesoporous Organic –Inorganic NiCo₂O₄ Hybrid Nanomaterials for Electrochemical Immunosensors. **Appl. Mater. Interfaces**, **3(4)**, 1366–1373 (2011).
 36. N Gan, H Jin, T Li, L Zheng. Fe₃O₄/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein. **Int. J. Nanomedicine**, **6**, 3259–3269 (2011).
 37. F Qu, H Lu, M Yang, C Deng. Electrochemical immunosensor based on electron transfer mediated by graphene oxide initiated silver enhancement. **Biosen. Bioelectron.**, **26(12)**, 4810–4814 (2011).
 38. Y Huang, Q Wen, JH Jiang, GL Shen, RQ Yu. A novel electrochemical immunosensor based on hydrogen evolution inhibition by enzymatic copper deposition on platinum nanoparticle-modified electrode. **Biosen. Bioelectron.**, **24 (4)**, 600–605 (2008).
 39. H Yang, R Yuan, Y Chai, L Mao, H Su, W Jiang, M Liang. Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification. **Biochem. Eng. J.**, **56**, 116–124 (2011).
 40. HP Liang, HM Zhang, JS Hu, YG Guo, LJ Wan, CL Bai. Pt hollow nanospheres: Facile synthesis and enhanced electrocatalysts. **Angew. Chem.**, **116**, 1566–1569 (2004).
 41. Y Liu, R Yuan, Y Chai, C Hong, S Guan. Preparation of a composite film electrochemically deposited with chitosan and gold nanoparticles for the determination of α -1-fetoprotein. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, **33**, 613–618 (2010).
 42. A Patiño. Inmovilización de una proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* sobre superficies de grafito modificadas con películas de quitosano. Tesis de Pregrado. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Mérida, Venezuela (2015).
 43. T Morse, P Schenck. Occupational Disease in Connecticut 2011. Articles - Research. Paper 62 (2011).
Disponible en: http://digitalcommons.uconn.edu/uchres_articles/62
Consultado: 12/12/2014
 44. E. Muñoz. Nanotecnología en Proteómica: microarrays de proteínas y nuevos sistemas de detección.
Disponible en: http://institutooroche.es/nuevasVias/69/Nanotecnologia_en_Proteomica_microarrays_de_proteinas_y_nuevos_sistemas_de_deteccion
Consultado: 12/12/2014
 45. M Vestergaard, K Kerman, E Tamiya. An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. **Sensors**, **7**, 3442-3458 (2007).
 46. J Tang, D Tang, R Niessner, D Knopp. A novel strategy for ultra-sensitive electrochemical immunoassay of biomarkers by coupling multifunctional iridium oxide (IrOx) nanospheres with catalytic recycling of self-produced reactants. **Anal. Bioanal. Chem.**, **400**, 2041–2051 (2011).
 46. B Su, J Tang, H Chen, J Huang, G Chen, D Tang. Thionine/nanogold multilayer film for electrochemical immunoassay of alpha-fetoprotein in human serum using biofunctional double codified gold nanoparticles. **Anal. Methods**, **2**, 1702–1709 (2010).
 47. DH Lin, YX Jiang, Y Wang, SG Sun. Silver Nanoparticles Confined in SBA-15 Mesoporous Silica and the Application as a Sensor for Detecting Hydrogen Peroxide. **J. Nanomaterials**, vol. 2008, Article ID 473791, 10 pages, (2008). doi:10.1155/2008/473791
 48. X Zhang, H Ju, J Wang. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications. Academic Press (2008).
 49. ZG Chen. Conductometric immunosensors for the detection of staphylococcal enterotoxin B based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrodes. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, **31**, 345–350 (2008).

50. J Tanga, J Huangb, B Sua, H Chena, D Tanga. Sandwich-type conductometric immunoassay of alpha-fetoprotein in human serum using carbon nanoparticles as labels. **Biochem. Eng. J.**, **53**, 223–228 (2011).
51. X Pei, B Zhang, J Tang, B Liu, W Lai, D Tang. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. **Anal. Chim. Acta**, **758(3)**, 1-18 (2013).
52. S Cheng, K Hotani, S Hideshima, S Kuroiwa, T Nakanishi, M Hashimoto, Y Mori, T Osaka. Field Effect Transistor Biosensor Using Antigen Binding Fragment for Detecting Tumor Marker in Human Serum. **Materials**, **7**, 2490-2500 (2014).
53. CS Lee, SK Kim, M Kim. Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing. **Sensors**, **9**, 7111-7131 (2009).
54. K Maehashi, T Katsura, K Kerman, Y Takamura, K Matsumoto, E Tamiya. Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field effect transistors, **Anal. Chem.**, **79**, 782-787 (2007).
55. B Qu, X Chu, G Shen, R Yu. A novel electrochemical immunosensor based on colabeled silica nanoparticles for determination of total prostate specific antigen in human serum. **Talanta**, **76**, 785–790 (2008).
56. G Lai, J Wu, H Ju, F Yan. Streptavidin-functionalized silver-nanoparticle-enriched carbon nanotube tag for ultrasensitive multiplexed detection of tumor markers. **Adv. Funct. Mater.**, **21**, 2938–2943 (2011).
57. N Gan, L Jia, L Zheng. A Sandwich Electrochemical Immunosensor Using Magnetic DNA Nanoprobes for Carcinoembryonic Antigen. **Int. J. Mol. Sci.**, **12**, 7410-7423 (2011).
58. J Lei, H Ju. Signal Amplification Using Nanomaterials for Biosensing. En: Applications of Nanomaterials in Sensors and Diagnostics. A Tuantranont (Ed.). Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, 14, 17–42 (2013).
59. X Yu, B Munge, V Patel, G Jensen, A Bhirde, JG Gong, SN Kim, J Gillespie, JS Gutkind, F Papadimitrakopoulos, JF Rusling. Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers. **J. Am. Chem. Soc.**, **128**, 11199–11205 (2006).
60. J Huang-Xian. Sensitive biosensing strategy based on functional nanomaterials. **Sci. Chi. Chem.**, **54 (8)**, 1202–1217 (2011).
61. W Cheng, L Ding, JP Lei, SJ Ding, HX Ju. Effective cell capture with tetrapeptide functionalized carbon nanotubes and dual signal amplification for cytosensing and evaluation of cell surface carbohydrate. **Anal. Chem.**, **80**, 3867–3872 (2008).
62. W Cheng, L Ding, S Ding, Y Yin, H Ju. A Simple Electrochemical Cytosensor Array for Dynamic Analysis of Carcinoma Cell Surface Glycans. **Angew. Chem.**, **48(35)**, 6465–6468 (2009).
63. N Gan, H Jin, T Li, L Zheng. Fe₃O₄/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein. **Int. J. Nanomedicine**, **6**, 3259–3269 (2011).
64. M Choudhary, V Kumar, A Singh, MP Singh, S Kaur, GB Reddy, R Pasricha, SP Singh, K Arora. Graphene Oxide based Label Free Ultrasensitive Immunosensor for Lung Cancer Biomarker, hTERT. **J. Biosens. Bioelectron.**, **4(4)**, 143-152 (2013).
65. J Wu, F Yan, X Zhang, Y Yan, J Tang, H Ju. Disposable Reagentless Electrochemical Immunosensor Array Based on a Biopolymer/Sol-Gel Membrane for Simultaneous Measurement of Several Tumor Markers. **Clin. Chem.**, **54(9)**, 1481–1488 (2008).
66. D Lu, J Wang, L Wang, D Du, C Timchalk, R Barry, Y Lin. A Novel Nanoparticle-Based Disposable Electrochemical Immunosensor for Diagnosis of Exposure to Toxic Organophosphorus Agents. **Adv. Funct. Mater.**, **21**, 4371–4378 (2011).
67. B Piro, S Reisberg, G Anquetin, HT Duc, MC Pham. Quinone-Based Polymers for Label-Free and Reagentless Electrochemical Immunosensors: Application to Proteins, Antibodies and Pesticides Detection. **Biosensors**, **3**, 58-76 (2013).

-
68. RE Ionescu, C Gondran, L Bouffier, N Jaffrezic-Renault, C Martelet, S Cosnier. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. **Electrochim. Acta.**, **55**, 6228–6232 (2010).
69. A Sassolas, B Prieto-Simón, JL Marty. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. **Am. J. Anal. Chem.**, **3**, 210-232 (2012).
70. E Zacco, R Galve, J Adrian, MP Marco, MI Pividori, S Alegret. Novel Electrochemical Immunoassay for the detection of toxic compounds in food and environment samples. **Biosens. Bioelectron.**, **22(9-10)**, 2184-91 (2007).
71. E Zacco, J Adrian, R Galve, MP Marco, S Alegret, MI Pividori. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. **Biosens. Bioelectron.**, **22(9-10)**, 2184-2191 (2007).
72. A Hayat, JL Marty. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. **Sensors**, **14**, 10432-10453 (2014).
73. H Zhao, J Tian, X Quan. A graphene and multienzyme functionalized carbon nanosphere-based electrochemical immunosensor for microcystin-LR detection. **Coll. Surf. B**, **103**, 38–44 (2013).
74. N Bojorge Ramírez, AM Salgado, B Valdman. The evolution and developments of immune-sensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Braz. J. Chem. Eng.**, **26(2)**, 227–249 (2009).
75. A Ahmadab, E Moore. Electrochemical immunosensor modified with self-assembled mono-layer of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water. **Analyst**, **137**, 5839-5844 (2012).
76. KA Fähnrich, M Pravda, GG Guilbault. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Anal. Lett.**, **35(8)**, 1269-1300 (2002).
77. M Liu, GA Rechnitz, K Li, QX Li. Capacitive Immunosensing of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and Protein Conjugates. **Anal. Lett.**, **31**, 2025–2038 (1998).
78. S Centi, E Silva, S Laschi, I Palchetti, M Mascini. Polychlorinated biphenyls (PCBs) detection in milk samples by an electrochemical magneto-immunosensor (EMI) coupled to solid-phase extraction (SPE) and disposable low-density arrays. **Anal. Chim. Acta**, **594**, 9–16 (2007).
79. MKA Kadir, IE Tohill. Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin Detection in Foods. **Toxins**, **2(4)**, 382–398 (2010).
80. HM Nassef, MC Bermudo, PJ Ciclitira, HJ Ellis, A Fragoso, CK O’Sullivan. Electrochemical Immunosensor for Detection of Celiac Disease Toxic Gliadin in Foodstuff. **Anal. Chem.**, **80**, 9265–9271 (2008).
81. X Sun, S Du, X Wang, W Zhao, Q Li. A Label-Free Electrochemical Immunosensor for Carbofuran Detection Based on a Sol-Gel Entrapped Antibody. **Sensors**, **11(10)**, 9520–9531 (2011).
82. S Shastry. Immunosensor techniques (Electrochemical, SPR and QCM) used in Food Safety. **Intl. J. Farm. & Alli. Sci.**, **2(3)**, 59-65 (2013).
83. S Ge, F Yu, L Ge, M Yan, J Yu, D Chen. Disposable electrochemical immunosensor for simultaneous assay of a panel of breast cancer tumor markers. **Analyst**, **137**, 4727-4733 (2012).
84. C Gouvea. Biosensors for Health Applications. En: Biosensors for Health, Environment and Biosecurity. PA Serra (Ed.). ISBN: 978-953-307-443-6 (2011).
Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biosensors-for-health-environment-and-biosecurity/biosensors-for-healthapplications>
- Consultado:** 12/12/2014
85. JF Rusling, CV Kumar, JS Gutkind, V Patel. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **Analyst**, **135**, 2496–2511 (2010).

-
86. M Mascini, S Tombelli. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, **13(7-8)**, 637-657 (2008).
 87. B Bohunicky, SA Mousa. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotech. Sci. Applicat.**, **4**, 1–10 (2011).
 88. A Escosura-Muñiz, C Parolo, A Merkoçi. Immunosensing using nanoparticles. **Materials Today**, **13(7-8)**, 24-35 (2010).