




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**Aspectos clave para el desarrollo de
inmunosensores digitales electroquímicos
sostenibles**

Dmitry Galyamin

Dirigida por

Prof. Dra. Neus Sabaté Vizcarra y Dr. Juan Pablo Esquivel Bojorquez

Tutorizada por

Prof. Dra. Iluminada Gallardo García

Instituto de Microelectrónica de Barcelona - Consejo Superior de
Investigaciones Científicas (IMB-CNM-CSIC)

Facultad de Ciencias - Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Programa de Doctorado en Electroquímica. Ciencia y Tecnología

Barcelona, 2022

Посвящается маме и папе

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Neus y Juan Pablo, por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por guiarme y por ayudarme tanto durante estos años. También quiero mencionar lo mucho que me han ayudado desde lo personal, que como ellos saben ha sido muy importante para mí.

Agradecer también a toda esa gente que me ha ayudado directamente con sus horas de trabajo a sacar adelante esta tesis. Buena parte del personal del CNM, los compañeros de grupo, Laura, Anna, Sole, Marina, Irene, David, Aina, Sunil y sin dudarle, Susana, que me ha brindado un grandísimo y necesario apoyo. A los colaboradores, en especial a Lena, Víctor y Neus del ICN2 y Joaquín y Eduardo de la UM. Por supuesto, Andrei, Natalia y Sergi. Огромное спасибо, moltes gràcies. Considero que me han aportado tanto antes de empezar la tesis, que buena parte es gracias a ellos. Y como no, Mateu por brindarme apoyo en diferentes consultas y en la redacción, y que junto a Roger hemos debatido tantos temas de electroquímica (bueno, y otros temas hasta las tantas...).

No tengo palabras para agradecer a toda la gente del CNM. Que con los descansos tomando café, charlas durante las comidas, los viernes en la Vila, viajes, cenas, conciertos y demás, han hecho que este camino fuera muy agradable. Por supuesto, no puedo dejar de mencionar a mis compañeros del ICP, a todos ellos muchísimas gracias por escucharme en mis “llores” mientras finalizaba la tesis y por tantas sonrisas que me habéis sacado. Y como no, a mi amiga de la infancia, Carla, por ayudarme siempre, por escucharme y por apoyarme tanto durante esta etapa.

Por último, y no menos importante, a toda mi familia. A pesar de estar separados en distintas ciudades del mundo, siempre habéis confiado en mí.

Gracias. Gràcies. Спасибо. Thank you.

Índice

Agradecimientos	v
Índice.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas	xv
Resumen.....	1
Resum.....	4
Abstract	7
1 Introducción	11
1.1 Dispositivos analíticos basados en papel.....	16
1.2 Digitalización de los PADs: la actualidad en la industria	20
1.3 Digitalización de los PADs: estado del arte en el mundo académico	24
1.4 PADs electroquímicos.....	25
1.5 ePADs autoalimentados	27
1.6 Objetivos	29
2 Fundamentos teóricos.....	33
2.1 Electroquímica	35
2.1.1 Fundamentos básicos.....	35
2.1.2 Cronoamperometría.....	41
2.1.3 Voltametría de barrido lineal y voltametría cíclica	44
2.1.4 Simulaciones computacionales.....	46

2.1.5	Espontaneidad de una reacción electroquímica y tipos de celdas electroquímicas.....	47
2.2	Espectroscopía de absorción UV-Vis.....	50
2.3	Inmunoensayo	51
2.4	Técnicas de prototipaje rápido	53
3	Estudio de la respuesta electroquímica en presencia de un sustrato de papel	55
3.1	Introducción	57
3.2	Resultados y discusión	60
3.3	Conclusiones	77
3.4	Materiales y métodos	79
4	Desarrollo de un inmunosensor autoalimentado	83
4.1	Introducción	85
4.2	Resultados y discusión	87
4.2.1	Diseño y funcionamiento del dispositivo	87
4.2.2	Optimización de la lectura y el inmunoensayo	93
4.2.3	Estudio y calibración del inmunoensayo en un sistema de tres electrodos	96
4.2.4	Estudio y calibración del sistema autoalimentado.....	100
4.2.5	Detección autoalimentada de CRP en una muestra artificial	103
4.3	Conclusiones	106
4.4	Materiales y métodos	108
5	Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas	111
5.1	Introducción	113

5.2	Resultados y discusión	117
5.2.1	Caracterización estructural	117
5.2.2	Actividad catalítica de la nanocería en medio ácido	120
5.3	Conclusiones	132
5.4	Materiales y métodos	134
6	Conclusiones y perspectivas futuras.....	137
	Bibliografía	145

Lista de figuras

Figura 1.1. Diseños de μ PAD según geometría. a) diseño 1D; diseño 2D; c) diseño 3D	20
Figura 1.2. Esquema de la sostenibilidad de los diferentes test POC en el mercado. Empresas que comercializan los dispositivos: (a) AccuBio Tech; (b) Abingdon Health; (c) BBI Solutions; (d) Aidian; (e) Alere Sotoxa; (f) ChemBio Dx; (g) Clear Blue.....	23
Figura 1.3. Esquema general de los objetivos de la tesis doctoral.	30
Figura 2.1. Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos	37
Figura 2.2. Valores de densidad de corriente (j) obtenidos a partir de la ecuación de Cottrell suponiendo que $c = 1$ mM, $n = 1$ y $D = 6.5 \cdot 10^{-10}$ m ² s ⁻¹ . a) representación lineal; b) representación de la j frente a $t^{-1/2}$; c) representación en escala doble logarítmica.	43
Figura 2.3. Gradiente de concentración en la capa de difusión en una respuesta cottrelliana suponiendo que $c = 1$ mM, $n = 1$ y $D = 6.5 \cdot 10^{-10}$ m ² s ⁻¹	44
Figura 2.4. Perfil de una voltametría cíclica de un electrodo completamente plano y de una reacción reversible.	45
Figura 2.5. Esquema de distintos tipos de celdas electroquímicas. a) Celda electrolítica; b) celda galvánica; c) celda de biocombustible.....	48
Figura 2.6. Típica curva de polarización de una celda de combustible.....	49
Figura 2.7. Esquema de una medida UV-Vis.....	50
Figura 2.8. Esquema general de un inmunoensayo de tipo Sándwich indirecto.	52

Figura 3.1. Imágenes SEM de los papeles más usados en los (e)PADs (a) W1, (b) NC, (c) FA y (d) FV	61
Figura 3.2. Respuesta cronoamperométrica de 1 mM de ferricianuro a -0.2V vs Ag/AgCl en KCl 0.1M en un SPE medido en una gota (negro) o en papel W#1 impregnado. a) representación en escala lineal; b) representación en $t^{-1/2}$; c) representación en escala log-log.	63
Figura 3.3. Representación gráfica de los regímenes difusivos dentro de un papel poco poroso. a) Esquema visual; b) Modelo teórico	67
Figura 3.4. Resultados de las simulaciones de CA en diferentes regímenes difusivos. El modelo geométrico de las simulaciones está representado en la figura 4.4b y los valores de los diferentes parámetros están dentro de la leyenda de la figura. a) resultados a escala lineal; b) resultados a escala logarítmica.....	70
Figura 3.5. Valores experimentales y de las simulaciones de las CA obtenidas en 1 mM de FcMeOH y en 1 mM de ferricianuro en los distintos papeles: W1, NC, FA y FV. a) CAs del FcMeOH en escala lineal; b) CAs del FcMeOH en escala logarítmica; c) CAs del ferricianuro en escala lineal; d) CAs del ferricianuro en escala logarítmica.	74
Figura 3.6. Simulaciones en COMSOL de la distribución de la concentración en el seno de distintos papeles en una medida de CA en 1 mM de ferricianuro	76
Figura 4.1. Esquema por capas de la semicelda anódica (izquierda) y la semicelda catódica (derecha)	88
Figura 4.2. Esquema por pasos del inmunoensayo.	89
Figura 4.3. Esquema y funcionamiento del dispositivo.	91
Figura 4.4. CV de 5 mM de HQ en 100 mM de PBS a $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ en un electrodo SPE	94

Figura 4.5. a) Respuesta CA obtenida a diferentes concentraciones de Ab-HRP (n=3); b) Corrientes obtenidas de las respuestas de CA a 5 segundos.	95
Figura 4.6. a) CA obtenidas para distintas diluciones de Ab-d y CRP. b) Corrientes obtenidas de las CA a t = 5s.	96
Figura 4.7. a) Respuestas CA del inmunoensayo a diferentes concentraciones de CRP. b) Corrientes obtenidas a los 5 segundos de la medida y su correspondiente ajuste matemático	97
Figura 4.8. LSV a 10 mV/s del ánodo (izquierda). Caracterización por LSV del cátodo (derecha) a diferentes concentraciones de Ab-HRP.	99
Figura 4.9. a) LSV de la pila final a diferentes concentraciones de Ab-HRP incubadas en eppendorf y transferidas a la NC. b) Potencia generada en la pila por las diferentes concentraciones de Ab-HRP conectadas a una resistencia de 270 k Ω . c) Potencia generada a diferentes por la pila durante 30 segundos en función de la concentración de Ab-HRP.....	103
Figura 4.10. A) Potencia generada por la pila conectada a una resistencia de 270 k Ω en un inmunoensayo completo a diferentes concentraciones de CRP. B) Potencia generada después de 30 segundos en función de la concentración de CRP.	104
Figura 5.1. Caracterización de la nanoceria sintetizada. a) Imágenes de HAADF-STEM. Distribución del tamaño de las partículas (incrustación). b) Espectro UV-Visible. Energía de bandgap óptico determinado por la ecuación de Tauc (incrustación). c) Perfil hidrodinámico medido por dispersión dinámica de luz. d) Análisis del potencial Z. e) Patrón de difracción de rayos X.....	118
Figura 5.2. Espectro de XPS de la nanoceria en la banda 3d	119
Figura 5.3. Espectro UV-VIS de la nanoceria dispersado en una solución tampón 100 mM de citrato (pH 4.4) durante 60 minutos	121

Figura 5.4. a) Espectro UV-Vis en función del tiempo de una solución de 1 mM de ferrocianuro expuesto a $8.1 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de nanoceria; b) Espectros UV-VIS finales de soluciones de 1 mM de ferrocianuro expuestas a diferentes concentraciones de nanoceria.....	123
Figura 5.5. (a) Valores de absorbancia a 420nm después de 180 minutos de reacción entre 1mM de ferrocianuro y diferentes concentraciones de nanoceria, entre $8.10 \cdot 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ to $1.62 \cdot 10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ y frente a la lacasa a una concentración de $1.62 \cdot 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$. (b) espectros de absorbancia de 1mM de ferrocianuro expuesto a $8.10 \cdot 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$ durante 60 minutos. (c) comparación de los espectros UV-Vis iniciales y después de 60 minutos de nanocerías comerciales y sintetizadas en el IMB-CNM frente a 1 mM de ferrocianuro. (d) relación atómica entre el ferricianuro obtenido de la reacción y el cerio atómico añadido a la solución.	125
Figura 5.6. Diagrama de Pourbaix del Ce [140].....	127
Figura 5.7. Valores de absorbancia a 420nm después de 60 minutos de reacción a una concentración fija de nanoceria de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a diferentes concentraciones de ferrocianuro.	129
Figura 5.8. a) Valores de tamaño de partícula medidas por DLS; b) concentración de NPs medidas por DLS; c) cantidad de cerio atómico medido por ICPMS.	130
Figura 5.9. a) Velocidad de reacción de dos lotes diferentes de Lacasa y dos nanocerías de diferentes síntesis en presencia de 1 mM de ferrocianuro; b) medidas de absorbancia da 420 nm a diferentes días de un sistema nanoceria-ferrocianuro (1mM).....	131

Lista de abreviaturas

Ab – Anticuerpo

BQ – Benzoquinona

CA – Cronoamperometría

CE – Contraelectrodo

CRP – Proteína C Reactiva

D_A – Coeficiente de difusión de un ion denominado “A”

E⁰ – Potencial estándar de reducción

ELISA – Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima

ePAD – Dispositivo electroquímico analítico basado en papel

ER – Electrodo de referencia

ET – Electrodo de trabajo

FA – Papel de algodón

FV – Fibra de vidrio

J_i – Flujo de una especie electroactiva “i”

LFA – Ensayo de flujo lateral

LOD – Límite de detección

NC – Nitrocelulosa

NP – Nanopartícula

OCP – Potencial de circuito abierto

OMS – Organización Mundial por la Salud

PAD – Dispositivo analítico basado en papel

μPAD – Micro dispositivos analíticos basados en papel

PDR – Pruebas de diagnóstico rápido

PIBM – Países de ingresos bajos y medios

POC – Pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia

PSA – Adhesivo sensible a la presión

PMMA – Polimetilmetacrilato

SEM – Microscopio de barrido electrónico

SPE – Electrodo serigrafados

V – Voltio

W1 – Papel comercial Whatman grado 1

Resumen

Los test en el lugar de asistencia del paciente (más conocido por su nombre en inglés, *Point-of-Care*) (POC) son necesarios porque permiten realizar un primer diagnóstico rápido fuera de un laboratorio especializado. Por un lado, dentro de los POC, podemos encontrar dispositivos relativamente sofisticados capaces de cuantificar y almacenar la información proporcionada por uno o varios sensores, con la desventaja de que en la mayoría de los casos su coste por unidad es muy elevado. Por el otro lado, encontramos dispositivos basados en papel extremadamente sencillos y de muy bajo coste, como los denominados test de flujo lateral, en los que se realiza un inmunoensayo con solo una gota de saliva, sangre, sudor u orina. Algunos ejemplos de estos últimos son el test de embarazo, el test del VIH o el más reciente test rápido para la detección del SARS-CoV-2.

Los test de flujo lateral tienen una respuesta cualitativa o semicuantitativa que permite una inspección visual del resultado, mientras que, si se requiere de una cuantificación más precisa e inequívoca, se necesita incorporar un sistema de lectura. En este sentido, se han estudiado diferentes técnicas para cuantificar la señal, siendo la más prometedora el uso de técnicas electroquímicas. Sin embargo, todas las propuestas realizadas hasta la fecha siguen usando fuentes de alimentación externas y módulos electrónicos, incumpliendo así buena parte de los criterios ASSURED propuestos por la OMS. Así, urge la necesidad de encontrar una alternativa viable capaz de aportar una lectura a un coste mínimo y sin requerir de equipos externos. En este sentido, esta tesis profundiza en diversos aspectos encaminados a estudiar la viabilidad de un test electroquímico autoalimentado de un solo uso que pueda cumplir con los

criterios de coste, simplicidad y sensibilidad requeridos para convertirse en un test de impacto global.

El primer capítulo experimental de la tesis describe qué efectos puede tener la selección de distintos papeles comúnmente empleados en los dispositivos analíticos basados en papel en la respuesta electroquímica de un sensor. Este estudio resulta novedoso, ya que, a pesar del gran número de dispositivos de papel publicados hasta la fecha, no existía ningún estudio detallado sobre el efecto de la porosidad del papel en la respuesta electroquímica de los mismos. Los resultados obtenidos experimentalmente fueron validados mediante simulaciones realizadas en COMSOL Multyphysics®. Gracias a ello se ha podido demostrar que la elección del papel juega un papel determinante en la sensibilidad del sistema.

En el segundo capítulo experimental se presenta un prototipo de un dispositivo basado en papel en el que se realiza un inmunoensayo completamente autoalimentado para la detección del biomarcador CRP. La detección del biomarcador se realiza mediante anticuerpos marcados con la enzima HRP. En el inmunoensayo se usa Mg como ánodo y la benzoquinona (BQ) producida por la enzima como catolito, de tal forma que la energía producida es directamente proporcional a la concentración del marcador a detectar. Los valores de detección obtenidos con este sistema se encuentran dentro de un rango clínico relevante - entre 1 y 3 mg·L⁻¹ de CRP - y con voltajes de salida mayores a 1.55 V. Este capítulo presenta un punto de partida hacia una nueva generación de inmunoensayos digitales y autoalimentados mucho más sencillos y asequibles que los actualmente presentes en el mercado del diagnóstico.

Finalmente, con el fin de substituir las enzimas por compuestos inorgánicos con mayor reproducibilidad y robustez que permitan disminuir variabilidades en los dispositivos de diagnóstico, así como simplificar el diseño y abaratar los costes, en el tercer capítulo experimental se procedió a estudiar la viabilidad de usar nanopartículas (NP) de ceria como agentes catalíticos. Los resultados nos

muestran que, a diferencia de lo ampliamente reportado, las NPs de ceria no actúan como catalizador de la reacción de oxidación de un mediador, sino que se comportan como agente oxidante. Esta característica hace que la cantidad de moléculas de ferrocianuro oxidadas por cada nanopartícula presente en la muestra sea fija y que, además, la reacción de oxidación se detenga una vez consumido todo el cerio disponible. La caracterización de estos materiales ha demostrado una alta reproducibilidad incluso en condiciones de almacenamiento poco controladas, lo que las hace firmes candidatas a substituir a las enzimas usadas en los inmunoensayos actuales.

Resum

Els test en el lloc d'assistència del pacient (més conegut pel seu nom en anglès, *Point-of-Care*) (POC) son necessaris per que permeten realitzar un primer diagnòstic ràpid fora d'un laboratori especialitzat. Per un costat, dins dels POC, podem trobar dispositius relativament sofisticats capaços de quantificar i emmagatzemar la informació proporcionada per un o varis sensors, amb la desavantatge que en la majoria de casos el seu cost per unitat es molt elevat. D'altra banda, trobem dispositius basats en paper extremadament senzills i d'un cost molt baix, com els denominats test de flux lateral, en el que es realitza un immunoassaig amb una sola gota de saliva, sang, suor o orina. Alguns d'aquests exemples d'aquests últims son els test d'embaràs, el test d'VIH o el més recent test ràpid per a la detecció del SARS-CoV-2.

Els test de flux lateral tenen una resposta qualitativa o semi-quantitativa que permet una inspecció visual del resultat, mentre que, si es requereix d'una quantificació més precisa i inequívoca, es necessita de la incorporació d'un sistema de lectura. En aquest sentit, s'han estudiat diferents tècniques per quantificar la senyal, sent la més prometedora l'ús de tècniques electroquímiques. No obstant, totes les propostes realitzades fins la data segueixen sent fonts d'alimentació externes i mòduls electrònics, incomplint així bona part dels criteris ASSURED proposats per la OMS. Així, urgeix la necessitat de trobar una alternativa viable capaç d'aportar una lectura a un cost mínim i sense requerir d'equips externs. En aquest sentit, aquesta tesi profunditza en diversos aspectes encaminats a estudiar la viabilitat d'un test electroquímic autoalimentat d'un sol ús que pugui complir amb els criteris de cost, simplicitat i sostenibilitat requerits per a convertir-se en un test d'impacte global.

El primer capítol experimental de la tesi descriu quins efectes pot tenir la selecció de diferents papers comunament emprats en els dispositius analítics basats en paper en la resposta electroquímica d'un sensor. Aquest estudi resulta nou, ja que, malgrat que hi ha un gran número de dispositius de paper publicats, no existeix cap estudi detallat sobre l'efecte de la porositat del paper en la resposta electroquímica d'aquests. Els resultats obtinguts experimentalment van ser validats mitjançant simulacions realitzades en COMSOL Multyphysics®. Gràcies a això, s'ha pogut demostrar que l'elecció del paper juga un paper determinant en la sensibilitat del sistema.

En el segon capítol experimental es presenta un prototip d'un dispositiu basat en paper en el que es realitza un immunoassaig completament auto-alimentat per la detecció del biomarcador CRP. La detecció del biomarcador es realitza mitjançant anticossos marcats amb l'enzim HRP. A l'immunoassaig es fa servir Mg com ànode i benzoquinona (BQ) produïda per l'enzim com catòlit, de tal forma que l'energia produïda es directament proporcional a la concentració del marcador a detectar. Els valors de detecció obtinguts amb aquest sistema es troben dins d'un rang clínic rellevant – entre 1 i 3 mg·L⁻¹ de CRP – i amb voltatges de sortida majors a 1.55V. Aquest capítol presenta un punt de partida cap a una nova generació d'immunoassais digitals i auto-alimentats molt més senzills i assequibles que els actualment presents en el mercat del diagnòstic.

Finalment, amb el fi de substituir els enzims per compostos inorgànics amb major reproductibilitat i robustesa que permetin disminuir variabilitats en els dispositius de diagnòstic, així com simplificar el disseny i abaratir els costos, en el tercer capítol experimental es va procedir a estudiar la viabilitat de fer servir nanopartícules (NP) de ceria com a agents catalítics. Els resultats ens mostren que, a diferència del que és àmpliament reportat, les NPs de ceria no actuen com catalitzadors de la reacció d'oxidació d'un mediador, si no que es comporten com agents oxidants. Aquesta característica fa que la quantitat de molècules de ferrocianur oxidades per cada NP present a la mostra sigui fixa i que, a més, la reacció d'oxidació s'aturi un cop consumit tot el ceri disponible.

La caracterització d'aquests materials han demostrat una alta reproductibilitat inclús en condicions d'emmagatzematge poc controlats, fet que el fa firmes candidates a substituir als enzims que es fan servir en els immunoassaigs actuals.

Abstract

Point-of-care (POC) tests are necessary because they allow a rapid first diagnosis to be made outside of a specialized laboratory. On the one hand, within the POC, we can find relatively sophisticated devices capable of quantifying and storing the information provided by one or several sensors, with the disadvantage that in most cases their cost per unit is very high. On the other hand, we find extremely simple and very low-cost paper-based analytical devices, such as the so-called lateral flow tests, in which an immunoassay is performed with just a drop of saliva, blood, sweat, or urine. Some examples are the pregnancy test, the HIV test or the most recent rapid test for the detection of SARS-CoV-2.

The lateral-flow tests have a qualitative or semi-quantitative response that allows a visual inspection of the result, however, when a more precise and unequivocal quantification is required, it is necessary to incorporate a reading system. In this sense, different techniques have been studied to quantify the signal, the most promising being the use of electrochemical techniques. However, up to date all the proposals have been carried out from external power sources and electronic modules, breaching part of the ASSURED criteria proposed by the WHO. Therefore, there is an urgent need to find a viable alternative capable of providing a reading at a minimum cost and without requiring external equipment. Consequently, this thesis delves into various aspects aimed at studying the feasibility of a single-use self-powered electrochemical test that can meet the criteria of cost, simplicity and sensitivity required to become a global impact test.

The first experimental chapter of the thesis describes which effects may have the selection of different papers commonly used in paper-based analytical

devices on the electrochemical response. This study is innovative as there was no there was no detailed study on the effect of paper porosity on the electrochemical response despite the larger number of studies published to date. The results obtained experimentally were validated by means of simulations carried out in COMSOL Multyphysics®. Thanks to this, it has been possible to demonstrate that the choice of paper plays a determining role in the sensitivity of the system.

In the second experimental chapter, a prototype of a paper-based device is presented in which a completely self-powered immunoassay is performed for the detection of the CRP biomarker. The detection of this biomarker is carried out by means of antibodies marked with the HRP enzyme. In the immunoassay, Mg is used as anode while benzoquinone (BQ) produced by the enzyme is used as catholyte, in such a way that the energy produced is directly proportional to the concentration of the marker to be detected. The detection values obtained with this system are within a relevant clinical range - between 1 and 3 mg·L⁻¹ of CRP - and with output voltages greater than 1.55 V. This chapter presents a starting point towards a new generation of digital and self-powered immunoassays much simpler and more affordable than those currently present in the diagnostic market.

Finally, in order to replace enzymes with inorganic compounds with greater reproducibility and robustness that allow to reduce variabilities in diagnostic devices, as well as simplify the design and lower costs, in the third experimental chapter we proceeded to study the feasibility of using ceria nanoparticles (NP) as catalytic agents. The results show us that, contrary to what has been widely reported, ceria NPs do not act as a catalyst for the oxidation reaction of a mediator, but rather behave as an oxidizing agent. This characteristic means that the number of ferrocyanide molecules oxidized for each NP present in the sample is fixed and, furthermore, the oxidation reaction stops once all the available cerium is consumed. The characterization of these materials has shown high reproducibility even under poorly controlled storage conditions,

which makes them strong candidates to replace the enzymes used in current immunoassays.

1 Introducción

Capítulo 1: Introducción

A pesar de los enormes avances médicos alcanzados durante las últimas décadas, las enfermedades infecciosas siguen teniendo una gran prevalencia y suponen una gran carga para la salud pública a nivel mundial [1,2]. Las principales enfermedades como el VIH/SIDA, la malaria, la hepatitis o la tuberculosis causan millones de muertes anuales [3]. Es por ello que, únicamente en el desarrollo de nuevos medicamentos, en la prevención y el tratamiento de estas enfermedades se invertirán miles de millones de dólares americanos durante los próximos años [4]. Uno de los principales obstáculos a superar es el hecho de que tanto el coste de la detección del contagio como su tratamiento se asume de manera muy desigual en diferentes áreas geográficas del mundo. En países de bajos ingresos esto ocasiona un diagnóstico tardío que puede conllevar severas consecuencias más allá del impacto inmediato de la propia infección.

En este escenario, el diagnóstico de calidad sigue siendo uno de los factores clave que permite un tratamiento rápido del paciente y limita una mayor propagación de las enfermedades. Por esta razón, los avances médicos han permitido el desarrollo de pruebas diagnósticas de alta precisión para la mayoría de las enfermedades infecciosas de importancia para la salud pública. Los inmunoensayos centralizados en laboratorio (por ejemplo, el test ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima”) y las pruebas moleculares (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, RT-PCR, del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) que permiten la identificación específica de patógenos con límites de detección (LOD) que alcanzan pocas copias por mL de muestra, resultan fácilmente disponibles a

través de los sistemas de salud pública o privada en la mayoría de países del mundo desarrollado [4]. Aun así, en estos países, y en especial los que tienen una asistencia sanitaria pública, las pruebas de diagnóstico clínico suponen una carga económica muy considerable [5,6]. Esto hace que estas pruebas no sean asequibles ni accesibles para los pacientes en países de ingresos bajos y medios (PIBM). Además, estas técnicas convencionales para diagnosticar enfermedades se suelen llevar a cabo en laboratorios especializados, y la obtención de los resultados puede demorarse varios días [7]. Este hecho ha sido superado de relieve durante la reciente pandemia de SARS-CoV-2, durante la cual se evidenció la necesidad de disponer de herramientas de diagnóstico rápido a nivel masivo como única manera efectiva de parar la transmisión del virus. Este hecho llevó a la inmediata saturación de los centros sanitarios y los laboratorios de análisis especializados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó este obstáculo a principios de 2003 al publicar un conjunto de criterios denominados ASSURED y que deben cumplirse para cualquier test de enfermedades infecciosas destinada a llegar a la población a nivel global y especialmente a la de los PIBM [8]. ASSURED incorpora tres características clave: precisión, accesibilidad y asequibilidad. Estos criterios - punto por punto - son los siguientes:

- **Asequible:** las tecnologías desarrolladas deben ser de un bajo coste, de manera que puedan ser adoptadas por todos los colectivos que las necesiten.
- **Sensible:** se deben evitar o minimizar los falsos negativos, especialmente en los casos de cribado.
- **Específico:** se deben evitar falsos positivos detectando en el test únicamente el analito en concreto.
- **Manejo sencillo:** los test deben ser fáciles de realizar, idealmente en 2 o 3 pasos y que no se requiera de personal cualificado.

- **Rápidos y robustos:** Los test idealmente deberían concluir en menos de 60 minutos para que se pueda realizar un diagnóstico durante la visita del paciente. Al poder ser accesibles en lugares remotos, es necesario que los test no se estropeen en el almacenamiento y transporte, e idealmente no deben sufrir alteraciones en condiciones adversas de temperatura, humedad o estrés mecánico.
- **Libre de equipos:** Idealmente no deberían requerir el uso de equipos sofisticados o en su defecto deberían operar en pequeños dispositivos alimentados por baterías.
- **Alcanzable para el usuario:** Se refiere a la logística para que el usuario final tenga la posibilidad de obtenerlo, evitando un transporte o un almacenamiento sofisticado. Esto habilita su disponibilidad en regiones remotas.

A pesar de que la llamada de la OMS es relativamente reciente, ya en 1883, en un artículo publicado en The Lancet [9], los autores mencionan las ventajas prácticas de los test analíticos de orina portátiles y de la necesidad en una rapidez en el diagnóstico:

“All busy practitioners must admit the clinical utility and importance of accurate, time-saving, and portable tests, by which they may, during their rounds, decide with precision and certainty, and on the spot, pathological conditions of the urine, or satisfy themselves, and their patients, if need be, without delay as to the soundness of that excretion.”

Es importante destacar, que 139 años más tarde, sigue existiendo la necesidad de conseguir dispositivos analíticos portátiles que den una respuesta precisa y unos resultados rápidos, asimismo cumpliendo todos los criterios ASSURED.

1.1 Dispositivos analíticos basados en papel

Las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) basadas en la tecnología del papel, en especial la de flujo lateral, han demostrado ser una herramienta bastante efectiva que cumple con prácticamente todos los criterios de la OMS. Esto se debe en parte, a las cualidades fisicoquímicas del material. El papel es fácil de fabricar, de obtener y de transportar, tiene un bajo coste, es biodegradable, muy ligero y tiene unas propiedades idóneas para su uso en diferentes aplicaciones analíticas [10–14]: su capilaridad hace que una muestra fluya a través del papel sin necesidad de una bomba externa, su color blanco le confiere un mejor resultado visual en test colorimétricos y por último, es un material que puede modificarse químicamente para poder fisorber, entre otras biomoléculas, anticuerpos o proteínas.

Los dispositivos analíticos basados en papel (PADs, por sus siglas en inglés de *Paper-Based Analytical Devices*) se han usado desde hace siglos en diferentes aplicaciones. El caso más antiguo se remonta al siglo XVIII, en el que el papel se usaba como sustrato junto al tornasol para observar cambios en el pH [15]. Pero no fue hasta el siglo XIX que volvió a usarse este material para detecciones analíticas, por ejemplo: como sustrato para la detección colorimétrica de iones metálicos, como uso cromatográfico para la separación de aminoácidos o el primer biosensor basado en papel para la detección de glucosa en orina, que se ha comercializado desde la mitad del siglo XX hasta nuestros días [15].

Uno de los desarrollos más revolucionarios en el campo del diagnóstico rápido apareció en los años 70 en forma de ensayos de flujo lateral [16] (LFAs, por sus siglas en inglés de *Lateral Flow Analysis*), representado en la figura 1.1a. Estos test permitieron transferir la laboriosidad de los test ELISA a una tira de papel que requiere uno o dos pasos de operación para obtener un resultado (generalmente aplicación de la muestra a analizar y de unas gotas de soluciones tampón para hacer fluir la muestra). La facilidad de manejo del test combinada

con su bajo coste lo han convertido en la opción preferente como prueba de diagnóstico en el lugar de asistencia (POC, por sus siglas en inglés de *point-of-care*) [17].

El principio básico de un LFA es muy simple [18]: la muestra (orina o sangre) impregna un papel denominado almohadilla de muestra (en inglés, *sample pad*), que en su interior contiene sales tamponantes y surfactantes para crear el medio idóneo para el test. La muestra fluye a través del test gracias a la capilaridad del papel hasta alcanzar otro papel (en inglés, *conjugate pad*) que contiene en su interior los anticuerpos (Ab, por sus siglas en inglés de *antibody*) específicos al analito que se quiera detectar. Estos anticuerpos a su vez están conjugados a nanopartículas (NPs), generalmente de oro o látex. La principal característica de estas NPs es que al agregarse producen un color característico dependiendo del material. Una vez conjugada, la muestra sigue fluyendo hasta la zona de detección, que consiste en una membrana de nitrocelulosa (NC), con anticuerpos de captura específicos inmovilizados en forma de líneas. En una de las líneas el analito se conjuga con otros anticuerpos específicos mientras que la otra línea conjuga con los anticuerpos sin el analito (control). De esta manera, el resultado, positivo o negativo, queda reflejado en forma de líneas, lo que permite la interpretación del resultado a simple vista.

Desde el desarrollo de esta tecnología, se han comercializado múltiples test para muchas detecciones diferentes, desde el tradicional test de embarazo hasta más recientemente la detección del SARS-CoV-2 [19]. En la tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de los analitos que se pueden detectar con LFAs comerciales y las principales empresas que los fabrican. Como se puede apreciar, el tipo de analito que actualmente puede detectarse mediante un LFA abarca campos de aplicación muy amplios que van desde enfermedades infecciosas, marcadores cardíacos, drogas de abuso, salud de la mujer, etc. También tienen aplicación en salud animal y en el sector agroalimentario. Sin embargo, y como veremos más adelante, hay un amplio margen de mejoras que puedan permitir detectar un mayor número de analitos con una mejor precisión.

Tabla 1.1: Analitos que se pueden detectar con LFA y empresas que las comercializan.

Aplicación (analito)	Empresas
Test de embarazo (hCG)	Clearblue; Mommed; Babycolor; Premom; Dothnix...
Infecciosas (VIH)	Hague Global; WSN; Mylan; Leti; Prima...
Infecciosas (<i>Helicobacter pylori</i>)	Oraquick; möLab; Prima; OneStep; Gegong...
Enfermedades cardiovasculares (Troponina I, Troponina T, CK-MB, mioglobina humana...)	Clartest; Alfa Scientific Design, Roche; Akralab; RightSign...
Cáncer (Sangre oculta en heces, FOB)	OneStep; Prima; McKesson; EZ detect; Alfa Scientific Design...
Prueba de próstata (PSA-1)	Prima; Akralab; Cerascreen; Medisur; Melio...
Test de drogas (cocaína, metanfetamina, THC, etc.)	SafeCare Bio-Tech; Veroval; Laboratorios Milo; Prima...
COVID-19 (SARS-CoV-2)	BioMedomics; BTNX; Alfa Scientific Design; Innovita Biological Technology Co.; SALOFA OY...

Un avance importante en el campo del diagnóstico en papel se llevó a cabo en 2007 [20], cuando el equipo del Prof. Whitesides de la Universidad de Harvard propuso aprovechar la capilaridad del papel para crear flujos no sólo en una sola dirección como en los LFAs, si no en varias direcciones en un plano (flujos 2D) (ver Figura 1.1b). A este tipo de dispositivos lo denominaron μ PADs (por sus siglas en inglés de *micro Paper-Based Analytical Devices*). A diferencia de

los LFAs, en los cuales se establece un flujo unidireccional a través de diferentes sustratos de papel, los μ PADs definen áreas o canales por donde fluir la muestra mediante una impregnación química que confiere hidrofobicidad o mediante barreras físicas como la impregnación de cera o el corte de las estructuras fluídicas mediante cuchilla o láser. Estas estrategias permiten mucha flexibilidad de diseño y habilitan funcionalidades propias de los sistemas microfluídicos clásicos. En este sentido, son especialmente relevantes los trabajos publicados por el grupo del profesor Yager de la Universidad de Washington, donde demostraron por primera vez la liberación secuencial de reactivos en el dispositivo o la posibilidad de crear flujos laminares paralelos [21,22]. Desde entonces, gracias a estos avances se han incrementado exponencialmente las posibilidades que ofrecen las estructuras basadas en papel y su fluidica y ha permitido un abanico de técnicas de fabricación y detección que ha dado lugar a dispositivos muy variados. Un ejemplo claro es el diseño de estructuras de tipo 3D, que exploran la posibilidad de plegar capas de papel sobre sí misma para controlar la dirección del flujo tanto en vertical como en horizontal y permitir establecer una o varias secuencias de eventos fluídicos (figura 1.1c) [23].

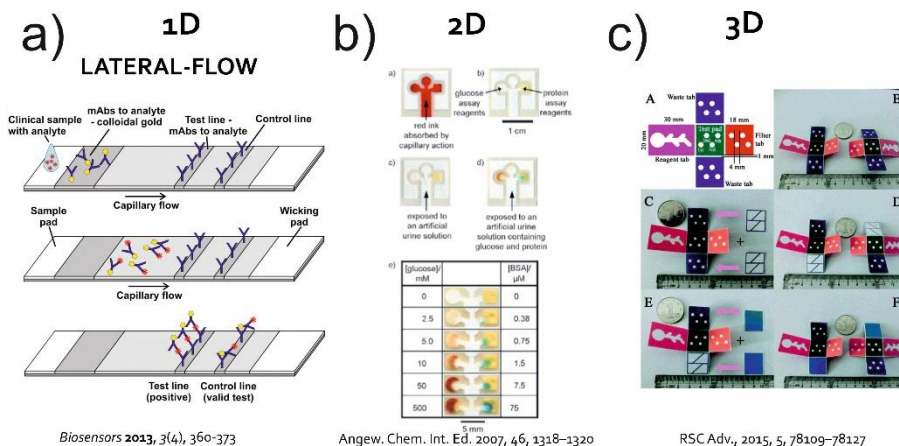


Figura 1.1. Diseños de μ PAD según geometría. a) diseño 1D; diseño 2D; c) diseño 3D

1.2 Digitalización de los PADs: la actualidad en la industria

La mayoría de los PADs utilizan la colorimetría como método para proporcionar una respuesta analítica. Los cambios de color son debidos a una reacción química o enzimática de un reactivo que, al interactuar con el analito a detectar, resulta en la formación de un producto con un color o una densidad óptica apreciable por el ojo humano. Por ejemplo, en los ensayos clásicos de flujo lateral, la acumulación de una alta concentración de NPs de oro debida al reconocimiento anticuerpo-analito en una zona de la nitrocelulosa genera una línea visible de color rojizo. Existen estrategias alternativas que aprovechan reacciones químicas o bioquímicas (enzimáticas) para producir cambios de color en presencia de distintos analitos. Un claro ejemplo lo encontramos en un trabajo publicado por el grupo del profesor John A. Rogers de la universidad Northwestern, Illinois, EE.UU., en el que combinan varias de estas técnicas para determinar la concentración de glucosa, lactato y cloruros del sudor en muestras reales mediante un dispositivo multicanal basado en papel [24]. Para la determinación de cloruros inmovilizan polihidroxietil metacrilato (pHEMA) en una zona del dispositivo, que, al reaccionar químicamente con los cloruros del

sudo, resulta en un cambio de incoloro a color púrpura. En los casos del lactato y la glucosa usan enzimas específicas que con un cosustrato proporcionan un cambio de color en el dispositivo según la concentración de analito.

Como ya se ha mencionado, la gran ventaja de este tipo de respuesta es su sencillez, en especial para la fabricación de los dispositivos, de tal forma que se pueden llegar a fabricar entre 1 y 100 millones de LFAs con un coste por unidad muy por debajo de 1 dólar americano [25]. A pesar de su gran éxito, este tipo de test poseen algunas limitaciones [26]. Por un lado, la lectura visual del test puede conllevar ambigüedades en su lectura, que depende de la agudeza visual del usuario, así como de las condiciones ambientales y una limitación en sensibilidad. Por otro lado, la interpretación de la respuesta es cualitativa o semicuantitativa, haciendo muy difícil la detección de rangos específicos. En los últimos años, la industria del diagnóstico ha invertido grandes cantidades de recursos para cuantificar el resultado de los inmunoensayos y reducir sus ambigüedades de lectura mediante la digitalización, que, a su vez, podría generar datos con los que facilitar el seguimiento de un cribado masivo como los realizados en épocas de pandemia.

Teniendo en cuenta la necesidad de la digitalización de los test rápidos y con el avance de las tecnologías y del denominado “*mobile health*” (*m-health*, que hace referencia al uso de las tecnologías móviles para controlar la salud de las personas), recientemente un grupo de expertos en el diagnóstico a nivel global revisó los criterios ASSURED y añadió a estos criterios los de estrategias de conectividad, sostenibilidad y facilidad en el manejo de las muestras de análisis, obteniendo los criterios REASSURED [27]. En este acrónimo, RE se concreta en:

- **Conectividad en tiempo real:** Los test deben generar una señal digital o estar conectados a un móvil o a un dispositivo lector capaz de interpretar el resultado y eventualmente enviarlo a la nube.

- **Facilidad en la recolección de muestras y/o sostenibilidad medioambiental:** Las pruebas deben diseñarse para la recolección y manejo de la muestra es sencillo y realizable por un usuario sin previo adiestramiento y deben causar el mínimo impacto medioambiental posible después de su desecho.

Hasta la fecha, se han desarrollado algunas estrategias de digitalización de los PADS. Algunas de ellas ya se encuentran en el mercado y se muestran en la figura 1.2. Partiendo de los test más sencillos, como el test de flujo lateral en el que la respuesta es visual (figura 1.2 (a)) [28], la trazabilidad se ha mejorado añadiendo códigos QR individuales en la carcasa de cada dispositivo para permitir una mejor identificación del test (figura 1.2 (b)) [29] mientras que la lectura se ha digitalizado mediante el uso de la cámara de un teléfono móvil como lector (figura 1.2 (c)) [30]. La lectura del test con los móviles resulta una solución de digitalización sencilla y de bajo coste. De hecho, muchas compañías están desarrollando estrategias para la mejora de la lectura del test y que permitan la influencia de la luz ambiental, la distancia y la orientación desde la que se toma la imagen o la diferencia entre cámaras de distintas marcas o modelos de móviles. El uso de los teléfonos móviles permite cumplir buena parte de la premisa REASSURED [27], no obstante, a día de hoy, no existe todavía un protocolo estándar que permita obtener la aprobación de los organismos regulatorios de dispositivos médicos como el sello de la FDA en EEUU o el mercado CE europeo.

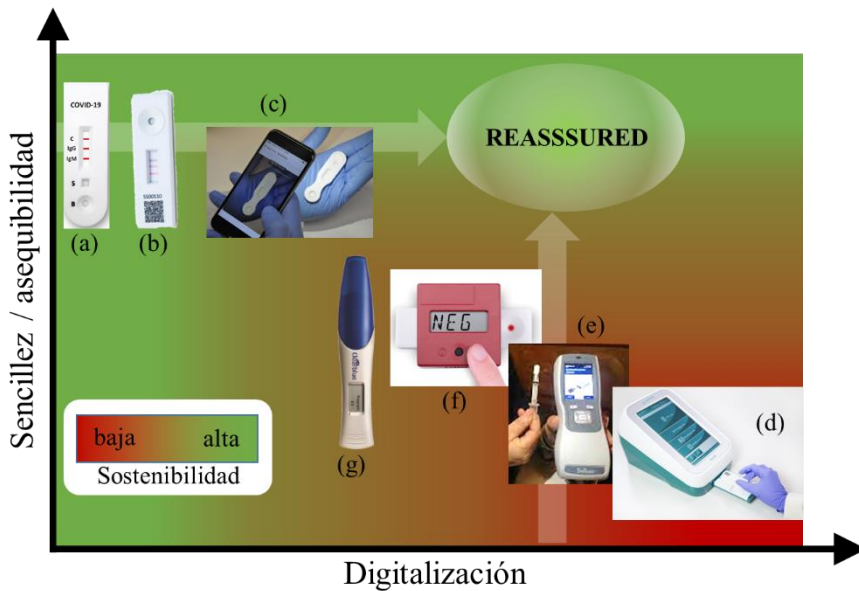


Figura 1.2. Esquema de la sostenibilidad de los diferentes test POC en el mercado.

Empresas que comercializan los dispositivos: (a) AccuBio Tech; (b) Abingdon Health; (c) BBI Solutions; (d) Aidian; (e) Alere Sotoxa; (f) ChemBio Dx; (g) Clear Blue

Paralelamente, la industria ha desarrollado lectores ópticos específicos [31]. Estos dispositivos suelen ser aparatos electrónicos de sobremesa relativamente sofisticados que se suelen usar en laboratorios o clínicas en las que se realizan centenares de test al día (figura 1.2 (d)) [32]. El principal inconveniente es que no se pueden transportar y requieren de una inversión inicial relativamente elevada, incumpliendo así buena parte del criterio ASSURED. Se ha intentado abordar esta problemática diseñando dispositivos más ligeros y transportables con una pantalla que muestre los resultados (figura 1.2 (e)), a veces incluso minimizando de forma sustancial los costes usando pantallas y softwares más sencillos (figura 1.2 (f)) [33]. Por último, podemos encontrar dispositivos de un solo uso digitalizados y especializados en el mercado de lujo como el test de embarazo con una pantalla integrada que muestra el resultado del test, como la

comercializada por Clearblue (figura 1.2 (g)) o el test de detección del SARS-CoV-2 con lectura electrónica comercializado por Ellume [34]. Sin embargo, incluso minimizando la electrónica, siguen siendo dispositivos con un coste elevado en comparación del LFA tradicional para poder ser adaptados masivamente por países de ingresos bajos y medios. Por esta razón, la búsqueda de estrategias que permitan desarrollar un test digital con impacto global es una de las principales motivaciones de esta tesis.

1.3 Digitalización de los PADs: estado del arte en el mundo académico

Dentro de la bibliografía podemos encontrar un gran número de estrategias para la cuantificación de la señal en los PADs. En la tabla 1.2 se presenta de manera esquemática cada uno de los métodos propuestos juntamente con el cumplimiento o incumplimiento de cada uno de los criterios REASSURED. Una propuesta que aparentemente puede ser sencilla es escanear los LFA en un escáner de oficina, para posteriormente tratar la imagen generada en el ordenador con programas de lectura de la intensidad de color y así poder cuantificar la señal [35]. Esta estrategia permite avanzar en la simplificación de la lectura, pero no cumple los criterios de accesibilidad o independencia de equipos. Estos dos aspectos son compartidos con las demás técnicas de lectura reportadas, como la lectura por la señal de SERS [36], por fluorescencia [37], por señal fototérmica [38] o por quimioluminiscencia [39]. Algunas de estas aproximaciones también se encuentran disponibles a nivel comercial, ya que cumplen con los criterios de sensibilidad y digitalización deseados. Además, son métodos rápidos, robustos, evitan falsos positivos o negativos... Sin embargo, en mayor o menor medida, todos requieren de un equipamiento sofisticado para la lectura de la señal o incluso de un ordenador con un software específico para el procesamiento de la misma. A pesar de ser avances hacia una cuantificación de la señal de los PADs, son propuestas poco factibles para

cumplir con todos los criterios que permitan su implementación en regiones PIBM o zonas remotas. Por último, cabe destacar que de todas las técnicas de lectura listadas en la tabla 1.2, la electroquímica tiene características que la convierten en es la más prometedora de cara a cumplir con el concepto REASSURED, si bien es necesario optimizar diversos aspectos de esta tecnología.

Tabla 1.2. Técnicas utilizadas en la lectura digital de los PADs y cumplimiento o incumplimiento de los criterios REASSURED

Lectura	R	E	A	S	S	U	R	E	D
Escáner [35]	✓	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
SERS [36]	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
Fluorescencia [37]	✓	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
Señal fototérmica [38]	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
Quimioluminiscencia [39]	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
Electroquímica alimentada por un potenciostato [40]	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓

1.4 PADs electroquímicos

En 2009, el grupo liderado por el profesor Charles S. Henry de la Universidad del estado de Colorado (EE.UU.), combinó las ventajas que confiere el papel con técnicas electroquímicas [40], abriendo así un nuevo camino hacia la digitalización de los PADs. Los dispositivos basados en papel en el que la cuantificación analítica se basa en métodos electroquímicos se denominan ePADs [41]. El uso de los métodos electroquímicos para la lectura de la respuesta parecen ser los más prometedores debido a su simplicidad, ya que

requieren de la gestión de señales eléctricas (voltaje e intensidad) fácilmente aplicables e interpretables con electrónica de bajo coste – como ya sucede con glucómetros de mano – a la vez que puedan alcanzar una alta sensibilidad y viabilidad económica [42]. Los ePADs se benefician de los desarrollos de la miniaturización de los sistemas electroquímicos convencionales [43], como la fotolitografía, y de las múltiples geometrías que se pueden desarrollar al trabajar con los sustratos basados en papel (ver apartado 1.1). Diversas publicaciones demuestran que los ePADs tienen una sensibilidad y reproducibilidad mayor que los colorimétricos y presentan unos límites de detección más bajos y unos rangos de detección más amplios [41]. Además, la gestión de la señal obtenida y su interpretación es mucho más sencilla que la de las medidas ópticas y las de las técnicas propuestas por otros investigadores descritas en el apartado 1.3. Gracias a estas ventajas, los ePADs han expandido su uso a múltiples aplicaciones como [44]: la detección de metales pesados, de compuestos orgánicos tóxicos para el medioambiente, de glucosa o lactato en sangre u orina, de bacterias en aguas, etc. Además, en distintos sustratos, se han reportado diferentes inmunosensores electroquímicos para la detección de enfermedades infecciosas de una forma rápida y eficaz [45,46].

Los ePADs también presentan una serie de inconvenientes de cara a su aplicación como test digitales de diagnóstico rápido: (i) Las lecturas electroquímicas de especies en disolución requieren de la estabilidad del flujo del sistema. Para evitar variaciones en la señal electroquímica se necesita detener el flujo o establecer un régimen constante y reproducible. Aunque los anticuerpos marcados con una etiqueta enzimática quedan anclados a la zona de lectura, los mediadores redox y/o el sustrato enzimático pueden fluir libremente. Como solución, algunos autores han propuesto separar la zona de test una vez realizado el inmunoensayo mediante el recorte con guillotina, para posteriormente llevar a cabo la lectura electroquímica en ausencia de flujo. No obstante, esto requiere de cierta laboriosidad que elimina la posibilidad de que el test pueda realizarse sin necesidad de formación previa. (ii) Los formatos

tradicionales de LF sufren la evaporación de la muestra que depende de las condiciones ambientales, lo que puede introducir variabilidad en el sistema. Este efecto puede minimizarse con la incorporación de un encapsulado específico. (iii) La sustitución de las etiquetas de tipo óptico (NPs de oro o látex) comúnmente usadas en los LFAs tradicionales por enzimas capaces de oxidar o reducir un sustrato conlleva pasos adicionales en la operación del test: se requiere añadir sustrato para la enzima y controlar el tiempo de la reacción enzimática. Además, la variabilidad de la respuesta enzimática según lotes encarece el proceso de fabricación y disminuye la robustez de la solución. (iv) Para evitar caídas óhmicas importantes en la respuesta electroquímica, el fluido de análisis debe contener un electrolito lo suficientemente conductor, lo cual puede representar incompatibilidades con la bioquímica del test y en concreto, con los anticuerpos de reconocimiento y captura, que pueden llegar a desnaturalizarse, perdiendo así su capacidad en el reconocimiento del analito. (v) La porosidad de los materiales basados en papel pueden afectar a la respuesta electroquímica del sensor y afectar así a los límites de detección y a la sensibilidad. El paso de solución líquida a sustrato de papel requiere de estudios específicos que resultan muy escasos en la literatura (vi) Por último, aunque más sencilla, la lectura electroquímica necesita de un módulo electrónico y una fuente de alimentación externa para la lectura de la respuesta que puede encarecer la solución final y puede generar impacto ecológico después de su uso.

Por estas razones, es necesario simplificar y rediseñar este tipo de dispositivos, para que sus ventajas como los bajos límites de detección o las altas sensibilidades puedan ser integradas en POCs comerciales.

1.5 ePADs autoalimentados

Los dispositivos portátiles y en particular los dispositivos de lectura de los ePADs requieren de diversos módulos electrónicos (módulo de procesamiento

de la señal, microprocesador, módulo de acondicionamiento de la señal) y de una fuente de energía externa (generalmente una batería). Uno de los principios básicos para una economía sostenible es minimizar los residuos. En los POCs, y en especial en los ePADs de un solo uso, esto se traduce a minimizar el número de componentes electrónicos manteniendo sus cualidades. Una de las estrategias para minimizar los componentes electrónicos es la implementación de estrategias para un autoalimentado del dispositivo, evitando así incorporar fuentes de alimentación externas, como por ejemplo pilas de botón, que genera un impacto negativo al medioambiente. De esta forma, minimizar los componentes electrónicos y evitar fuentes de alimentación externas permite que se cumplan de forma más ajustada los criterios REASSURED, que sea más sostenible con el medioambiente y a la vez sean dispositivos más asequibles, lo que permitirá su uso en los países con recursos limitados.

Existen dos formas distintas de poder obtener un inmunoensayo completamente autoalimentado. Por un lado, se puede generar la energía necesaria mediante una pila de combustible enzimática (por ejemplo de glucosa, lactato o colesterol), que alimente la lectura electroquímica del inmunoensayo [47–50]. Por otro lado, existe la posibilidad de que la energía obtenida sea directamente proporcional a la cantidad de analito del sistema [50], por lo que en este caso, la fuente de energía se convierte en un sensor.

El diseño de un inmunoensayo autoalimentado en el que la energía obtenida sea directamente proporcional a la respuesta, resulta en un cambio de paradigma, ya que pasamos de preguntar cuánto analito hay en el sistema a cuánta energía estamos generando, siendo esta energía generada directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Este cambio abre las puertas a plantear nuevas estrategias de lectura de la respuesta con una alta simplificación del sistema. Sólo un número reducido de grupos de investigación están estudiando la implementación de este concepto en dispositivos completamente operativos. Entre estos grupos se encuentra el grupo SPEED (*Self-Powered Engineered Devices Research Group*) del Instituto de Microelectrónica de

Barcelona (IMB-CNM-CSIC), grupo en el cual se ha llevado a cabo esta tesis doctoral.

1.6 Objetivos

A pesar de que los dispositivos analíticos basados en papel con lectura electroquímica (ePADs) reportados hasta la fecha presentan unas características prometedoras para la cuantificación de la señal en los test en el lugar de asistencia (PoC), los test de inmunoensayo siguen sin cumplir los objetivos REASSURED. Éstos presentan cierta complejidad en su manipulación a la par que su precio se eleva sustancialmente respecto al clásico test de flujo lateral (LFA). Esto les impide posicionarse como una opción sólida para solucionar los problemas del diagnóstico rápido global.

El objetivo general de esta tesis es estudiar e implementar estrategias que permitan eliminar algunas de las limitaciones actuales de los ePADs para así poder aproximarlos a una solución efectiva. Basándonos en los aspectos problemáticos de estos dispositivos anteriormente descritos, en esta tesis se han propuesto los siguientes objetivos específicos (esquemáticos en la figura 1.2):

- **Estudio del efecto en la respuesta electroquímica de los materiales basados en papel más usados en la industria del diagnóstico rápido.** Para realizar el paso de LFA a ePAD, es necesario realizar una lectura electroquímica en el papel, sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio relacionado con el efecto de esta matriz porosa en una respuesta electroquímica.
- **Realización de un inmunoensayo autoalimentado basado en papel que permita la autocuantificación de resultado sin necesidad de una fuente de alimentación externa.** Para la lectura electroquímica es necesario implementar una electrónica compleja y una batería, que en

algunos de los casos se ha resuelto mediante lecturas autónomas basadas en pilas de combustible. A pesar de ser un gran avance y disminuir la electrónica y evitar el uso de potenciostatos, los voltajes obtenidos son menores a 1V y las potencias que se obtienen no son suficientes para alimentar una electrónica externa.

- **Estudio de la viabilidad de sustituir las enzimas, necesarias como marca electroquímica del inmunoensayo, por una alternativa inorgánica capaz de realizar la misma función, disminuyendo así la variabilidad y dependencia temporal asociada a los marcadores bioquímicos.** Para realizar el test electroquímico es necesario sustituir las NPs de oro o látex por enzimas capaces de oxidar o reducir un mediador y así poder realizar la medida electroquímica. Las enzimas son materiales que se desnaturalizan con facilidad y presentan una alta variabilidad entre lotes, por lo que su sustitución por NPs con actividad catalítica similar a las enzimas podría ser un gran avance que otorgara robustez y simplicidad de operación a estos dispositivos.

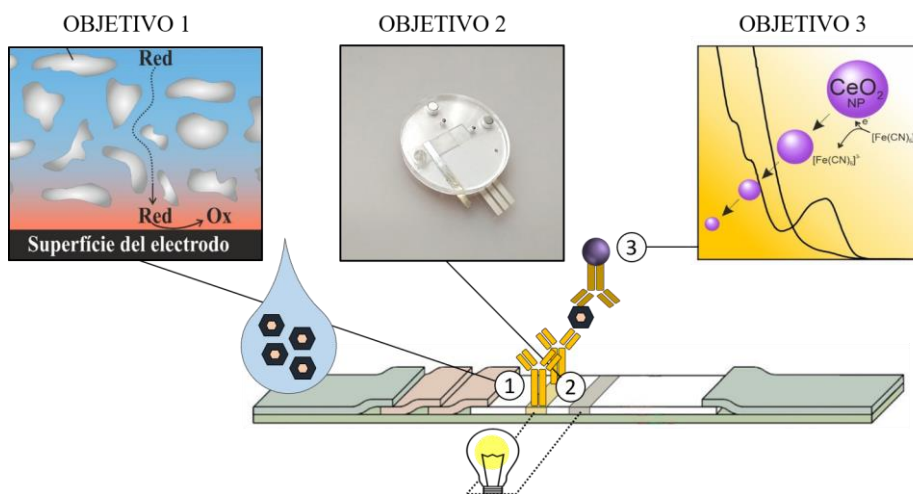


Figura 1.3. Esquema general de los objetivos de la tesis doctoral.

2 Fundamentos teóricos

Capítulo 2: Fundamentos teóricos

En este capítulo se detallarán los fundamentos básicos de las principales técnicas y disciplinas científicas que se han empleado y desarrollado a lo largo de esta tesis.

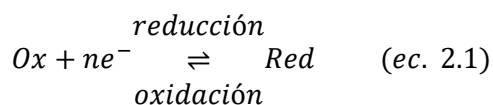
2.1 Electroquímica

Para los apartados relacionados con la electroquímica, se han tenido en cuenta distintas fuentes bibliográficas de gran reconocimiento científico a nivel internacional [51–56].

2.1.1 Fundamentos básicos

La electroquímica es la rama de la química dedicada a estudiar los procesos de intercambio de electrones de una reacción química redox a través de una interfase mediante cambios de corriente eléctrica a través de un circuito externo. Actualmente es ampliamente usada en muchas aplicaciones distintas como la corrosión de un metal, baterías, química analítica o como es el caso de esta tesis, para aplicaciones en dispositivos biomédicos.

En general, una reacción electroquímica se produce en la interfaz entre un colector de corriente (electrodo) y un conductor iónico (electrolito) cuando una especie se oxida (pierde electrones) o se reduce (gana electrones):



El estudio de un proceso electroquímico se suele llevar a cabo en las denominadas celdas electroquímicas, donde dos o más electrodos están sumergidos en un electrolito y conectados externamente a través de un circuito eléctrico. Generalmente, el estudio está focalizado a un único proceso electroquímico, para ello se usa la denominada celda de tres electrodos (figura 2.1), formada por:

- **Electrodo de trabajo (ET):** es el electrodo donde se produce la reacción de interés. Estos electrodos pueden ser activos, es decir, se forman o se disuelven a medida que se produce una reacción electroquímica (por ejemplo: $\text{Mg}_{(s)} \rightarrow \text{Mg}^{2+}_{(aq)} + 2e^-$), o inertes, que son aquellos que no experimentan cambios a medida que se produce la reacción deseada (por ejemplo: $\text{FcMeOH}_{(aq)} \rightarrow \text{FcMeOH}^+_{(aq)} + 1e^-$ en un electrodo de carbón vítreo).
- **Electrodo de referencia (ER):** es un electrodo que mantiene un potencial constante durante las condiciones de una medida electroquímica y que sirve para determinar o controlar el potencial del electrodo de trabajo, ya que es imposible determinar el potencial de un electrodo aislado. Existen numerosos electrodos de referencia, como el electrodo estándar de hidrógeno (H_2/H^+), también denominado SHE, que se usa como referencia “universal” para reportar los potenciales estándar (y se ha determinado que su potencial es 0V). Existen también otros tipos de electrodos de referencia, que son ampliamente usados por su estabilidad ante diferentes condiciones (en electrolitos acuosos que contengan iones), como por ejemplo el electrodo de referencia Ag/AgCl (a 25°C 3M, +0,205V, 3.5M, +0.210V vs SHE, saturado +0.197V vs SHE... a 25°C) o Hg/Hg₂Cl₂ (calomelanos, +0.244V vs SHE).
- **Contraelectrodo (CE) o electrodo auxiliar:** sirve para cerrar el circuito y produce la corriente con signo opuesto al ET. Debe ser totalmente inerte al estudio y lo suficientemente grande o activo para

poder generar la corriente demandada por el ET. Ante estas condiciones, se suele usar platino o materiales carbonosos conductores.

Los electrodos están conectados entre ellos por un circuito eléctrico externo. Entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia no se genera ninguna corriente, únicamente se controla el potencial. Mientras que entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo es por donde fluyen los electrones.

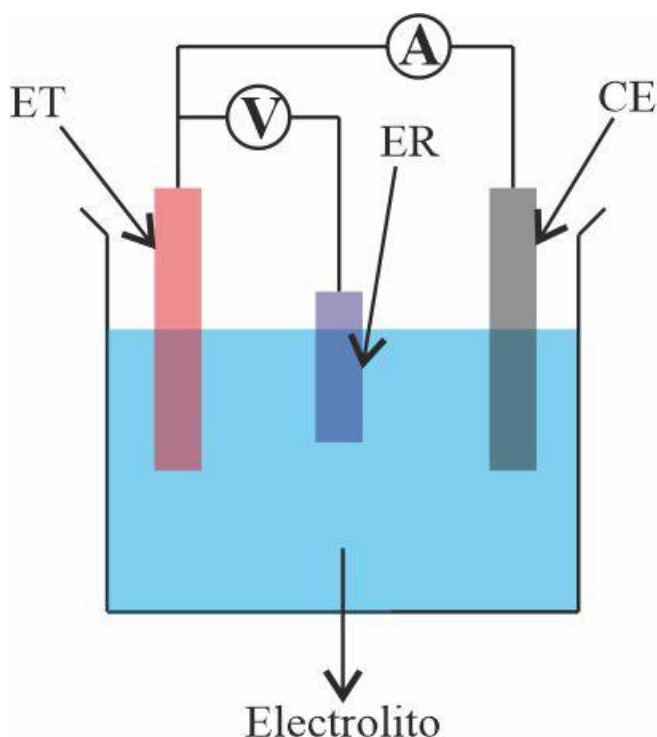


Figura 2.1. Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos

Según la IUPAC, el potencial de una reacción electroquímica, E (V), se define como el potencial de un electrodo cuando no hay paso de corriente eléctrica a través de la celda y se hayan establecido todos los equilibrios locales de transferencia de carga a través de los límites de las interfases (excepto en las posibles uniones electrolito-electrolito) y los equilibrios químicos locales [57]. Este potencial se describe mediante la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (ec. 2.2)$$

Donde E^0 es el potencial estándar de reducción, R la constante de los gases, T la temperatura, n el número de electrones y F la constante de Faraday y a_i es la actividad de una especie en disolución.

La corriente producida en un electrodo es generalmente suma de una corriente capacitiva y una corriente farádica. En el primer caso, al aplicar un potencial en la superficie del electrodo, esta se carga positiva o negativamente, de tal manera que los iones de la carga opuesta disueltos en la disolución se aproximan a la superficie del electrodo generando así una corriente eléctrica. Por otro lado, la corriente farádica es aquella en la que hay involucrado un intercambio de uno o más electrones a través de la interfase, desde el electrolito al electrodo (oxidación) o viceversa (reducción).

La corriente farádica (i) que pasa por el electrodo en función del tiempo está relacionada con el flujo (J) de la especie electroactiva O (portador o aceptor de electrones) que llega a la superficie del electrodo. Por lo tanto, la expresión de la corriente es:

$$i = -nFAJ_o(x = 0, t) \quad (ec. 2.3)$$

Donde A el área del electrodo, x la distancia con respecto a la superficie del electrodo y t el tiempo. El flujo o transferencia de masa, es decir el movimiento de las especies desde un punto de la disolución hasta otro, puede generarse por tres causas diferentes:

- **Migración:** movimiento de las especies cargadas a causa de un gradiente de potencial
- **Convección:** el transporte de las especies causada por un movimiento hidrodinámico (agitación) o por un gradiente de concentración (convección natural)

- **Difusión:** movimiento aleatorio y espontáneo de una especie de un lugar a otro

La suma de las tres contribuciones anteriores se expresa mediante la ecuación de Nernst-Planck:

$$J_0 = -D_0 \nabla c_0 - \frac{z_0 F}{RT} D_0 C_0 \nabla \varphi + c_0 \vartheta \quad (\text{ec. 2.4})$$

Dónde D_0 es el coeficiente de difusión de la especie química, c_0 la concentración de dicha especie en disolución, z_0 la carga de la especie química, T la temperatura y ϑ la velocidad hidrodinámica. Los términos expresados a la derecha de la ecuación corresponden respectivamente a las contribuciones de difusión, migración y convección.

En los casos en los que hay ausencia de agitación externa y las disoluciones acuosas contengan una alta concentración de electrolito inerte (o electrolito soporte), las contribuciones por migración y convección quedan anuladas y la ecuación 2.4 queda simplificada a:

$$J_0 = -D_0 \nabla c_0 \quad (\text{ec. 2.5})$$

Para conocer el flujo de una especie en función del espacio-tiempo es necesario resolver la primera y la segunda ley de Fick. Por lo tanto, teniendo en cuenta la ecuación 2.3, 2.5 y la primera ley de Fick, la expresión de la corriente en el electrodo es:

$$i = -nFAD_0 \nabla c_0 \quad (\text{ec. 2.6})$$

Y el gradiente de concentración desde la superficie del electrodo hasta el seno de la disolución en función del tiempo queda expresada por la segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial c_0(x, y, z, t)}{\partial t} = D_0 \nabla^2 c_0 \quad (\text{ec. 2.7})$$

La expresión de la corriente en un electrodo en función del tiempo requiere de la resolución de ecuaciones diferenciales parciales, y para resolverlas es necesario fijar unas condiciones de contorno para cada caso en concreto. Supongamos un sistema unidimensional en el que inicialmente la concentración de la especie O (c_0^*) se encuentra distribuida uniformemente por toda la disolución:

$$C_0(x, t = 0) = c_0^* \quad (\text{ec. 2.8})$$

Asumiendo que el gradiente de concentración no se ve alterado por las paredes de la celda, se puede asumir un sistema semi-infinito:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} c_0(x, t) = c_0^* \quad (\text{ec. 2.9})$$

La concentración en cada momento de la especie electroactiva en la superficie del electrodo está relacionada directamente con el potencial que se le aplica:

$$c_0(0, t) = f(E) \quad (\text{ec. 2.10})$$

Resolver matemáticamente las soluciones para cada caso que pueda devenir en una celda electroquímica suele requerir de complejas soluciones matemáticas. Sin embargo, se han resuelto los casos más comúnmente encontrados en los laboratorios. Por ejemplo, cuando un electrodo de trabajo totalmente plano está sumergido en una disolución con una pequeña cantidad de especie electroactiva (generalmente entre 1 y 10 mM), con una alta concentración de electrolito soporte (generalmente 100 veces mayor que la especie electroactiva) y sin agitación externa. En las siguientes secciones se detallan las soluciones en un potencial fijo y en un barrido de potencial.

Las técnicas electroquímicas pueden depender de que variable (E , i , t ó c) sea la que se controle o la que se quiera estudiar. Podemos clasificar las técnicas en tres tipos diferentes:

- **Potenciométricas:** Control del potencial en corriente continua
- **Amperométricas:** Control de la intensidad en corriente continua

- **Impedimétricas:** Control del potencial o de la intensidad en corriente alterna

A su vez, cada una de las técnicas se puede realizar en equilibrio (por ejemplo, potencial constante y estudiar la variación de la corriente en función del tiempo) o en transición (por ejemplo, estudiar la corriente haciendo un barrido de potencial). En los siguientes subapartados nos centraremos en las técnicas que se han usado durante esta tesis.

2.1.2 Cronoamperometría

Supongamos el caso en el que se aplica un potencial al electrodo en el que la cinética de la reacción sea mucho más rápida que la difusión de la especie hacia el electrodo y, por lo tanto, toda la especie O que llega a la superficie del electrodo se reduce rápidamente. En este caso, el valor de $f(E)$ de la ecuación 2.10 es igual a 0, simplificándose la ecuación a:

$$c_O(0, t) = 0 \quad (\text{ec. 2.11})$$

Mediante complejos cálculos matemáticos, teniendo en cuenta la segunda ley de Fick (ecuación 2.7) y las condiciones de contorno expresadas en las ecuaciones 2.8, 2.9 y 2.11, se puede obtener una ecuación para cuantificar la corriente obtenida en un electrodo en función del tiempo, la ecuación de Cottrell:

$$i(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}c_O^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (\text{ec. 2.12})$$

Antes de hacer uso de esta ecuación frente a unos datos experimentales, se ha de recordar que:

- Para que esta ecuación tenga validez se han de cumplir las siguientes condiciones: electrodo totalmente plano, difusión totalmente uniforme

en el sistema, condición de difusión semi-infinito y la ausencia de convección natural

- Los potenciostatos tienen ciertas limitaciones, sobre todo, limitaciones al obtener corrientes muy elevadas, como las que se predicen en los primeros milisegundos en la ecuación de Cottrell
- Limitaciones por resistencias no compensadas y la posible generación de corrientes no farádicas

La respuesta cottrelliana (aquella que sigue la ec. 2.12) de un electrodo se suele representar gráficamente en valores absolutos, negativos o positivos, en ambos ejes tal y como se representa en la figura 2.3a. En el campo de la electroquímica analítica, se suele representar la corriente en función de $t^{-1/2}$, para así, de la pendiente poder extraer la concentración del analito (figura 2.3b). Asimismo, permite confirmar que la respuesta (corriente) está controlada por difusión y tiene un comportamiento cottrelliano. Por último, cabe destacar que, en algunos estudios teóricos, la respuesta se representa en una escala doble logarítmica, representando $\log(j)$ en función de $\log(t)$ (figura 2.3c). De la ecuación de Cottrell (ec. 2.12) se puede deducir que la pendiente que se obtiene de esta representación tiene un valor de -0.5, es adimensional y no depende en ningún caso de la concentración, coeficientes de difusión o áreas activas de los electrodos, por lo tanto, de esta forma es mucho más preciso confirmar un control por difusión homogéneo y un comportamiento cottrelliano. Los valores obtenidos en estas gráficas se han obtenido suponiendo una concentración de 1 mM de la especie electroactiva y con un valor de D de $6.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

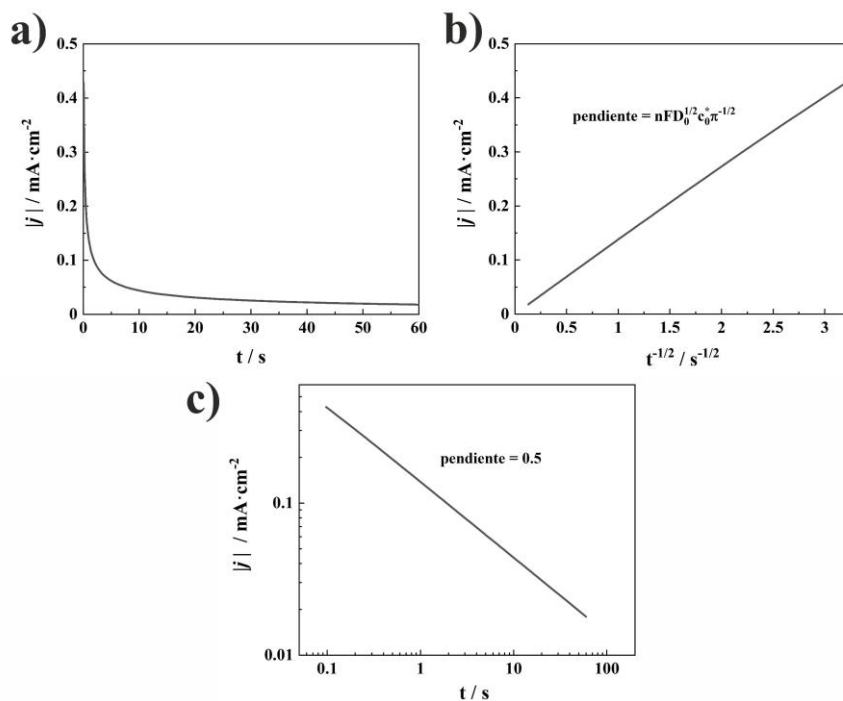


Figura 2.2. Valores de densidad de corriente (j) obtenidos a partir de la ecuación de Cottrell suponiendo que $c = 1$ mM, $n = 1$ y $D = 6.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. a) representación lineal; b) representación de la j frente a $t^{-1/2}$; c) representación en escala doble logarítmica.

En la figura 2.4 se puede observar el gradiente de concentración desde la superficie del electrodo hacia el seno de la disolución a diferentes tiempos comprendidos desde $t = 1$ s hasta $t = 60$ s. La región en la que la concentración de la especie electroactiva es diferente a la del seno de la disolución es la identificada como capa de difusión. Se puede observar como esta región puede llegar a tener una distancia cercana a 0.8 mm después de 60 segundos de reacción en estas condiciones. El valor de la capa de difusión a un tiempo t depende de $D^{-1/2}$.

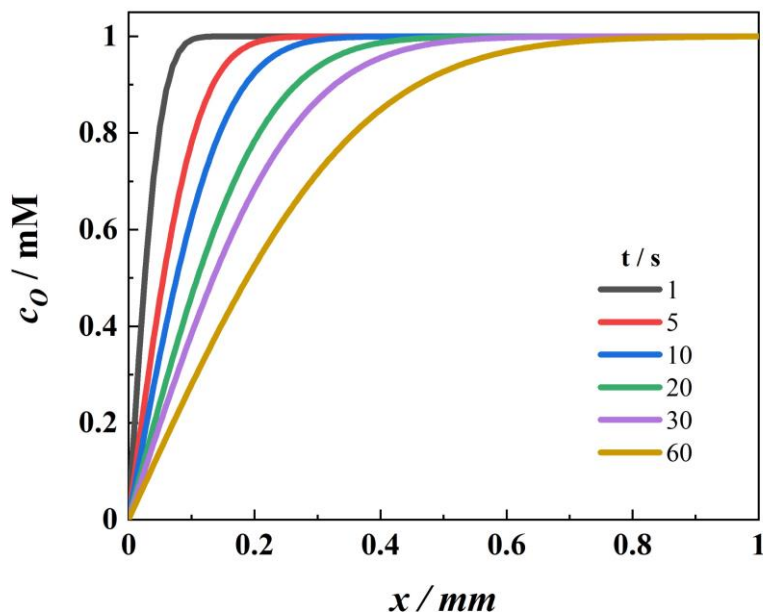


Figura 2.3. Gradiente de concentración en la capa de difusión en una respuesta cottrelliana suponiendo que $c = 1 \text{ mM}$, $n = 1$ y $D = 6.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

2.1.3 Voltametría de barrido lineal y voltametría cíclica

En ocasiones, para el estudio de un sistema electroquímico no es suficiente aplicar un único potencial como en el caso de la cronoamperometría. Es posible obtener mayor información del sistema variando el potencial en función del tiempo. En la mayoría de casos este potencial varía linealmente con el tiempo desde un potencial inicial (E_1) hasta a otro potencial (E_2). A esta técnica se la conoce como voltametría de barrido lineal. Es posible obtener aún más información haciendo un barrido cíclico del potencial, a velocidad controlada, en el que se parte de E_1 hasta E_2 y volviendo de nuevo a E_1 (voltametría cíclica). Las condiciones de contorno son las expuestas en la sección 2.1.1. $E(t)$ de la ecuación 2.10 queda expresado como:

$$E(t) = E_i - vt \quad (\text{ec. 2.13})$$

De nuevo, para resolver todas las condiciones de contorno teniendo en cuenta las ecuaciones de la sección 2.1.1 y la ecuación 2.13, hace falta aplicar resoluciones matemáticas complejas. Este sistema es aún más complejo que el descrito por la cronoamperometría y las ecuaciones para definir la respuesta (j) en función del potencial son demasiado complejas. De entre todas las soluciones y cálculos posibles, por simplicidad, la ecuación más usada es la ecuación de Randles-Ševčík, en la que se expresa la intensidad del pico voltamétrico (i_p , máximo valor de la corriente de respuesta) como:

$$i_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D_0^{1/2} c_0^* v^{1/2} \quad (\text{ec. 2.14})$$

El perfil de una respuesta en una voltametría cíclica está representada en la siguiente figura 2.4.

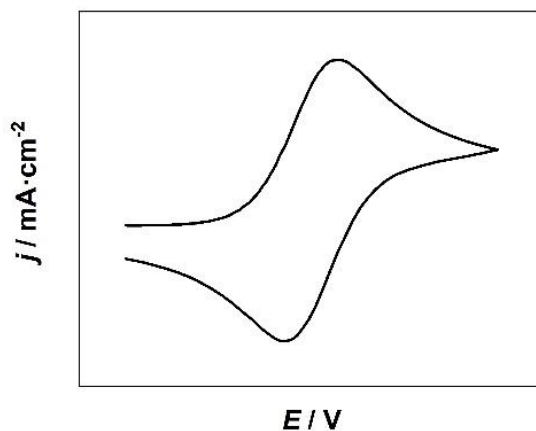


Figura 2.4. Perfil de una voltametría cíclica de un electrodo completamente plano y de una reacción reversible.

2.1.4 Simulaciones computacionales

Hasta ahora hemos supuesto un electrodo totalmente plano y con unas condiciones determinadas. También se han resuelto para otras geometrías como en el caso de los microelectrodos, electrodos esféricos o electrodos en forma de disco. Sin embargo, existen muchas otras condiciones mucho más difíciles de determinar y que requieren de un cálculo matemático aún más complejo. En algunos estudios, los autores suponen una respuesta puramente cottrelliana en todo el rango sin tener en cuenta factores como la rugosidad del electrodo, contribuciones por diferentes tipos de difusión en diferentes zonas de la capa de difusión, flujo lateral en los bordes de un electrodo, etc. Incluso, en algunas ocasiones es simplemente imposible obtener una ecuación que describa la corriente de un electrodo, por lo que se suele hacer uso de aproximaciones.

Las simulaciones mediante métodos computacionales son una gran solución práctica para poder predecir la respuesta electroquímica de un sistema complejo. Miles de artículos han sido publicados sobre el estudio mediante métodos computacionales de diferentes efectos como la rugosidad del electrodo, electrólisis con bajo contenido de electrolito soporte, diferentes geometrías de celda, etc.

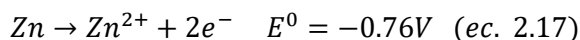
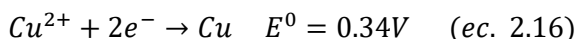
En la gran mayoría de los casos anteriores se han resuelto mediante un código informático (Fortran 77, Python, C, C++...), pero gracias a los avances tecnológicos, a día de hoy existen diferentes herramientas que facilitan los estudios fisicoquímicos en todas sus facetas. Una de estas herramientas es el software COMSOL Multyphysics©. Desde el comienzo de su comercialización en 1986, y en especial en la última década, se han publicado multitud de estudios en simulación electroquímica. Durante la tesis se han realizado simulaciones, para más información ver el capítulo 3.

2.1.5 Espontaneidad de una reacción electroquímica y tipos de celdas electroquímicas

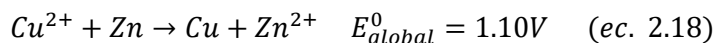
Una reacción química es espontánea cuando la variación de la energía de Gibbs (ΔG) es negativa mientras que no es espontánea cuando su valor es positivo. Es posible definir ΔG en función del potencial global de una reacción electroquímica (E_{global}^0):

$$\Delta G = -nFE_{global}^0 \quad (ec. 2.15)$$

Supongamos las semirreacciones de reducción de cobre y oxidación del zinc:



En este supuesto, la reacción global es:



Al obtener un valor positivo del potencial global de la reacción electroquímica, en este caso 1.10V, ΔG es negativo y por lo tanto la reacción es espontánea. En el caso que las semirreacciones fueran las inversas, oxidación del cobre y reducción del Zn, la reacción global sería no espontánea al obtener un valor de $E_{global}^0 = -1.1V$ y por lo tanto ΔG tendría un valor positivo.

Las celdas electroquímicas se pueden clasificar como galvánicas o electrolíticas. Las celdas electrolíticas son aquellas en las que las reacciones se producen al aplicarse un potencial eléctrico externo entre ánodo y cátodo para impulsar las reacciones electroquímicas no espontáneas (figura 2.5a). Mientras que una celda galvánica es aquella en la que las reacciones de oxidación y de reducción se producen de forma espontánea cuando se conectan a través de un conductor eléctrico externo (figura 2.5b). Este tipo de celdas se usa para convertir la energía química en energía eléctrica. Las celdas galvánicas

incluyen aquellas denominadas primarias, que son aquellas que no se pueden recargar (por ejemplo, Zn-MnO₂), secundarias, aquellas que se pueden recargar (por ejemplo, ion-Li) o celdas de combustible, que son aquellas en las que existe un flujo continuo de combustible (por ejemplo, H₂-O₂). Dentro de las celdas de combustible encontramos aquellas en las que una o ambas reacciones dependen de vías bioquímicas, las denominadas celdas de biocombustible. En la figura 2.5c, se esquematiza una celda de biocombustible en la que en el ánodo se oxida la glucosa por mediación de la glucosa oxidasa mientras que en el cátodo se reduce el oxígeno disuelto en la disolución por mediación de la enzima lacasa.

En ocasiones es necesario separar la celda en dos compartimentos para evitar que haya reacciones parásitas. Por ejemplo, si la celda galvánica de la figura 2.5b no estuviera separada en dos compartimentos, el Zn²⁺ disuelto reaccionaría directamente sobre la superficie del cobre evitando así el paso de electrones por el circuito externo. Para cerrar el circuito, en este tipo de configuraciones es necesario el uso de un puente salino, que mantendrá la electroneutralidad en ambas semiceldas.

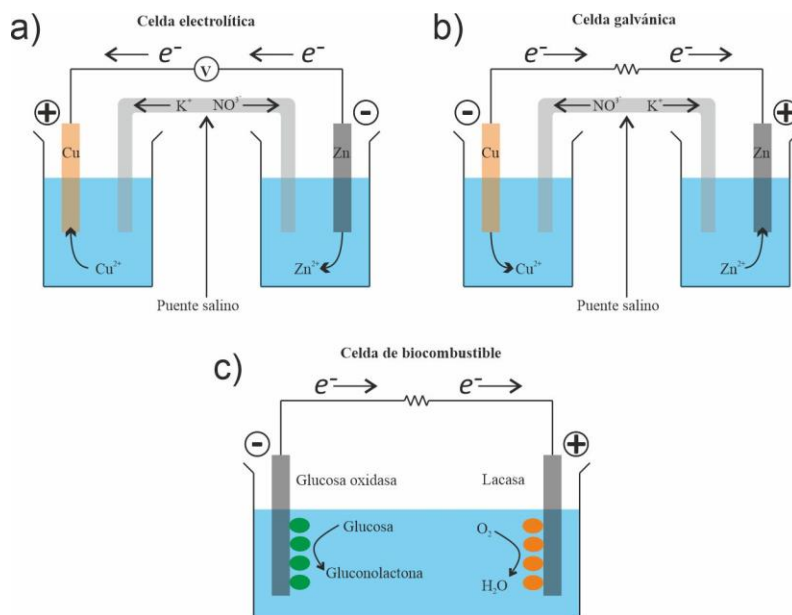


Figura 2.5. Esquema de distintos tipos de celdas electroquímicas. a) Celda electrolítica; b) celda galvánica; c) celda de biocombustible

Las celdas de combustible se suelen caracterizar mediante la voltametría de barrido lineal (explicada en la sección 2.1.3) a partir del cual se obtienen las denominadas curvas de polarización o curvas I-V. En ellas, se representa el potencial en función de la densidad de corriente generada (figura 2.6). En este tipo de curvas, generalmente se distinguen tres regiones:

- La primera, a densidades de corrientes bajas, donde el potencial de celda disminuye drásticamente debido a las pérdidas por activación.
- La segunda, a densidades de corrientes intermedias, donde se observa una disminución lineal del potencial con la corriente debido a resistencias óhmicas del sistema.
- La tercera, a densidades de corrientes elevadas, donde el potencial de celda vuelve a caer drásticamente debido a que se consume todo el combustible que llega a los electrodos y no es capaz de alimentar al sistema.

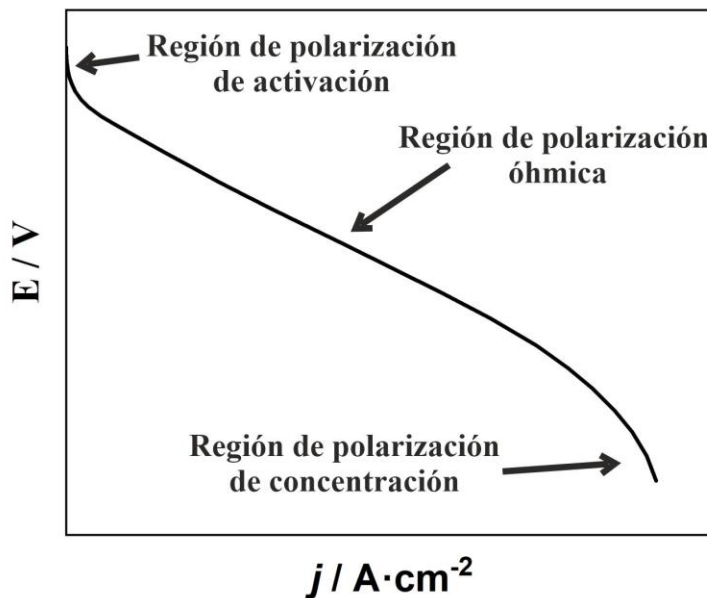


Figura 2.6. Típica curva de polarización de una celda de combustible.

2.2 Espectroscopía de absorción UV-Vis

La espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica cuantitativa que mide la cantidad de radiación electromagnética que absorbe una molécula en longitudes de onda comprendidas entre 280 y 800 nm, que corresponde al rango detectable por el ojo humano. Esta técnica se usa ampliamente para distintas aplicaciones como en inmunoensayos ELISA, detección de moléculas en matrices con muchos compuestos diferentes o estudios de cinética de reacciones.

El espectrofotómetro es el instrumento que se usa para la espectroscopía UV-Vis. En un espectrofotómetro, una lámpara emite luz en un amplio espectro de longitudes de onda. Esta luz pasa por un monocromador, dejando pasar un haz de luz de una única longitud de onda. Este haz pasa por la cubeta que contiene la muestra hasta que finalmente llega al detector. El funcionamiento de un espectrofotómetro está esquematizado en la figura 2.7.

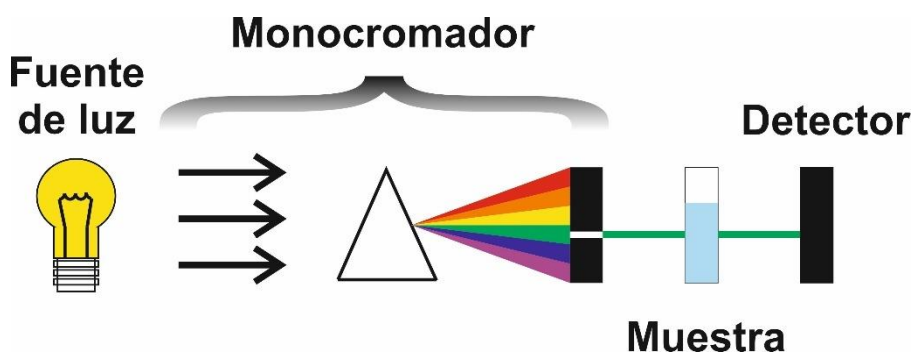


Figura 2.7. Esquema de una medida UV-Vis

Parte de la luz es absorbida por las moléculas que se encuentran dentro de la muestra y parte es atravesada hasta llegar al detector. La luz absorbida dependerá de la estructura electrónica de cada material y la que atraviesa la muestra está gobernada por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon Lc = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\log_{10}(T) \quad (\text{ec. 2.19})$$

Donde A es la absorbancia, ε la absortividad molar, c la concentración de la especie, I la intensidad de la luz que atraviesa la muestra, I_0 la intensidad de la luz del blanco de la muestra y T la transmitancia.

2.3 Inmunoensayo

Los inmunoensayos son técnicas analíticas basadas en las uniones específicas y de alta afinidad entre un anticuerpo (Ab) y una molécula diana. Para poder llevar a cabo la detección de este reconocimiento anticuerpo-antígeno, uno de los componentes debe marcarse con un marcador, generalmente nanopartículas o enzimas. Como se ha señalado en la introducción de la tesis, en los test de flujo lateral una de las marcas más habitual es la nanopartícula de oro, mientras que en los inmunoensayos electroquímicos o en los elaborados en laboratorios especializados, se suelen marcar con enzimas. Estos ensayos se pueden realizar en distintas plataformas, algunas diseñadas específicamente para estos ensayos o también se pueden realizar en distintos materiales como la nitrocelulosa.

Los inmunoensayos se pueden clasificar según su formato en: directo-competitivo, indirecto-competitivo, de tipo sándwich no competitivo y de tipo sándwich indirecto y no competitivo. En esta tesis nos hemos centrado en este último caso debido a su alta sensibilidad y un menor requerimiento de concentración de anticuerpos respecto a los otros tipos de inmunoensayos. El esquema general del inmunoensayo seleccionado se puede encontrar en la figura 2.6. En primer lugar, una cantidad fija del Ab de captura se fija sobre un soporte sólido, generalmente para ello se usan plataformas específicas de plástico, pero también se pueden llegar a fijar sobre soportes de tipo papel. A continuación, se añade la solución que contiene el antígeno (analito) y seguidamente una solución con el Ab de detección. En ocasiones, el Ab de detección contiene ya una enzima, pero en otras, es necesario realizar otro paso

más en el que se añade el denominado Ab secundario. El Ab secundario, enlazado a una enzima, reacciona específicamente con el Ab de detección. Para eliminar los restos de matriz no específica y los anticuerpos no unidos se realizan etapas de lavado después de cada una de las incubaciones. Finalmente, para cuantificar la presencia de analito, se añade el sustrato cromogénico o luminiscente que reacciona específicamente con la enzima del Ab secundario y genera cambios en la absorbancia o fluorescencia de la solución.

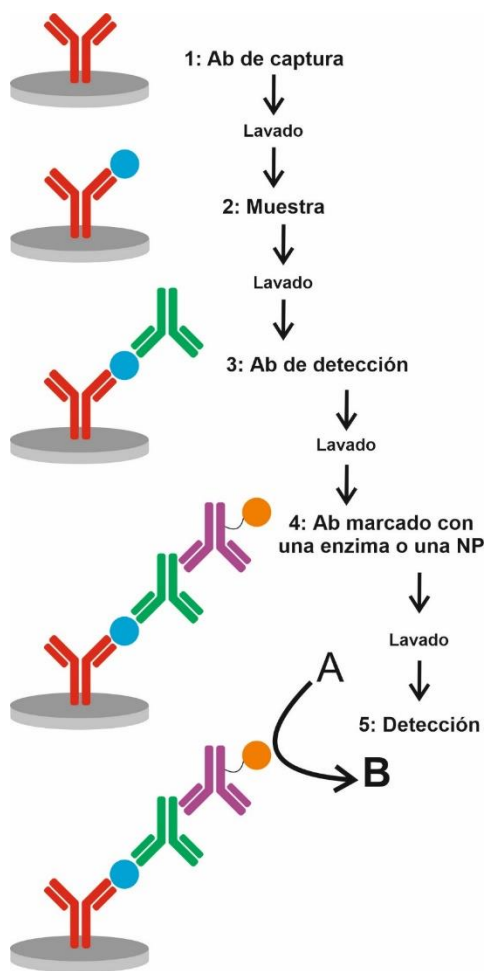


Figura 2.8. Esquema general de un inmunoensayo de tipo Sándwich indirecto.

2.4 Técnicas de prototipaje rápido

La tecnología impresa para la fabricación de electrodos y circuitos eléctricos confiere numerosas ventajas frente a la tradicional basada en silicio. Entre ellas podemos encontrar la posibilidad de una producción a gran escala más rápida, fabricación a temperatura ambiente, un menor coste de producción y mayor versatilidad. A escala industrial el proceso más extendido es el denominado roll-to-roll (R2R), simplificando la producción con una velocidad de proceso muy elevada. Para la impresión de las tintas sobre los sustratos, generalmente se usan dos técnicas distintas, inkjet-printing y screen-printing. En el primero de los casos, se deposita secuencialmente la tinta conductora en forma de pequeñas gotas, produciendo capas de 10 μm aproximadamente. Sin embargo, es una técnica lenta si la comparamos con el screen-printing. El segundo de los casos es la más usada. El screen-printing se basa en la deposición de una fina capa conductora o aislante a través de una malla sobre un sustrato con un patrón definido. Esta técnica es muy versátil y es compatible con sustratos de todo tipo como el papel, el plástico o todo tipo de tejidos.

3 Estudio de la respuesta electroquímica en presencia de un sustrato de papel

Capítulo 3: Estudio de la respuesta electroquímica de un SPE en presencia de un sustrato papel

3.1 Introducción

Los ePADs se caracterizan por la combinación de sustratos basados en papel y una configuración miniaturizada de dos o tres electrodos [43,58]. Gracias a la multifuncionalidad que presentan los materiales porosos basados en papel (por ejemplo la capacidad de almacenamiento de reactivos, transporte de fluidos por capilaridad, funcionalización de los poros con biomoléculas, etc.) se han diseñado múltiples arquitecturas para conseguir la mejor combinación papel-electrodo en diferentes aplicaciones de sensado [59]. Una forma de clasificar los ePADs desde el punto de vista de su arquitectura es a partir de la relación papel-electrodo: (i) cuando están impresos sobre el propio papel [15,59,60] o (ii) cuando los electrodos y el papel son fabricados por separado y puestos en contacto con posterioridad [61–64].

La impresión de los electrodos directamente sobre los sustratos de papel es una forma muy eficaz de introducir la miniaturización de los mismos electrodos de manera compacta. Además, esto permite generar corrientes relativamente elevadas por área geométrica ya que, al serigrafiar sobre el material poroso, el área activa se ve incrementada sustancialmente. En 2009 se publicó por primera vez un procedimiento para la fabricación de electrodos y pistas conductoras directamente sobre un sustrato de papel [40]. En este trabajo, los autores usaron la fotolitografía para crear el patrón de las pistas y los electrodos. Desde entonces, se han diseñado diferentes técnicas con el mismo propósito: serigrafía [65], impresión por inyección de tinta [66], impresión manual con un lápiz de

grafito [67], filtración de tintas al vacío [68]... Sin embargo, estas técnicas presentan ciertas limitaciones [41]. En cada una de ellas es necesaria una optimización del depósito de cada una de las tintas (debido a la variabilidad en las viscosidades según el fabricante) para cada uno de los sustratos (debido a la variabilidad en la porosidad según el sustrato). En ocasiones es difícil obtener unas condiciones óptimas, dificultando la homogeneidad en la infiltración de las tintas, generando así irreproducibilidades entre lotes. Además, en muchas ocasiones el depositar la tinta directamente sobre el sustrato puede introducir interferencias, como, por ejemplo, causar una disminución de los centros activos en los que el material puede fisisorber los anticuerpos en un ePAD de sensado inmunológico.

Así, muchos autores prefieren realizar medidas electroquímicas en sustratos de papel mediante la aplicación de los mismos sobre un electrodo previamente serigrafiado (SPE) en un sustrato independiente. Aunque esta combinación es menos compacta, se evita la variabilidad durante el proceso de serigrafía. Además, las propiedades físico-químicas del papel y de los SPE han sido ampliamente estudiadas por separado.

Respecto a los sustratos basados en papel, existen amplios estudios sobre las propiedades que afectan a sus características y funcionalidad dentro de los PADs. La modificación de los sustratos basados en papel con diferentes grupos funcionales para mejorar la respuesta de los PADs o la posibilidad de anclar biomoléculas son otros factores destacables y ampliamente estudiados [60]. Respecto a la influencia de los materiales de fabricación de los SPE se han publicado variedad de artículos en los que se estudia sus respuestas electroquímicas a micro y macro escala. A modo de ejemplo podemos destacar los efectos de la rugosidad del electrodo de trabajo en una respuesta electroquímica, los pretratamientos químicos y electroquímicos necesarios para la activación superficial o la caracterización de distintas tintas conductoras de diferentes marcas comerciales [69–75].

A pesar del gran número de publicaciones relacionadas con los ePADs, hasta el día de hoy no se ha desarrollado ningún estudio sistemático sobre el efecto que puede tener la elección del tipo de papel en una medida electroquímica. Curiosamente, varios artículos mencionan la necesidad de la exploración de las propiedades y efectos de estos materiales en la respuesta electroquímica para poder desarrollar con más eficacia los ePADs más estables y con límites de detección más bajos [41,43]. No obstante, la mayoría de autores no justifican la elección del sustrato seleccionado en su dispositivo ni comentan el posible efecto que éste haya podido ejercer sobre la respuesta electroquímica obtenida. Tal y como podemos observar a través de los artículos referenciados a lo largo de esta tesis, la mejora y desarrollo de nuevos (e)PADs está focalizada en la arquitectura de los dispositivos, el tipo de ensayo o la técnica de cuantificación, pero en ningún caso en el estudio del efecto de la combinación SPE-papel.

El objetivo de este capítulo es pues analizar la influencia de los diferentes sustratos basados en papel sobre la señal amperométrica de un SPE. Los materiales que se han estudiado se encuentran disponibles a nivel comercial y provienen de la industria del diagnóstico. El análisis de los resultados experimentales obtenidos y su posterior simulación mediante un software basado en elementos finitos, permite extraer la evolución temporal del perfil de los gradientes de concentración de las especies electroactivas en cada uno de los materiales caracterizados, así como disponer de un modelo aplicable a otros tipos de sustratos que se quieran estudiar en un futuro. Además, los resultados de este capítulo proporcionan una serie de recomendaciones a la hora de seleccionar los sustratos con el fin de obtener ePADs con mejores prestaciones.

3.2 Resultados y discusión

En primer lugar, se tomaron imágenes de los diferentes materiales estudiados en un microscopio de barrido electrónico (SEM) con el objetivo de observar su estructura. Los materiales seleccionados han sido usados en otros ePADs reportados o bien son usados como elementos constituyentes de los test de flujo lateral:

- **Whatman de grado 1 (W1, Figura 3.1a).** Este material ha sido ampliamente usado como papel cromatográfico. Fue el sustrato empleado en los primeros trabajos publicados sobre microfluídica en papel por el grupo del profesor Whitesides [20] y por este motivo la mayor parte de las publicaciones realizadas por otros autores se han llevado a cabo en este material.
- **Nitrocelulosa (NC, Figura 3.1b).** Este material, se emplea como sustrato para la inmovilización de anticuerpos en los test de flujo lateral. Es un material muy delgado y frágil que requiere una manipulación cuidadosa. Se han reportado diversos trabajos en los que se realizan medidas electroquímicas con este sustrato para la cuantificación de un inmunoensayo [76,77].
- **Fibra de algodón (FA, Figura 3.1c).** Este material se usa en los test de flujo lateral como absorbente para drenar el líquido que fluye por el test y crear un flujo continuo que permite la circulación de la muestra a analizar a través de la zona de test. Por esta razón, este material presenta una elevada capacidad de succión y un grosor muy superior a la NC.
- **Fibra de vidrio *Standard 14* (FV, Figura 3.1d).** Este material, se usa en los test de flujo lateral como *sample pad*. Generalmente, en este material se almacenan los anticuerpos marcados con NPs de oro o látex. Una vez la muestra fluye a través de esta zona, los anticuerpos son arrastrados hacia la NC, donde les esperan los anticuerpos de captura

en la zona de test. Para evitar la adsorción de los anticuerpos en esta la matriz porosa, este material presenta una baja interacción química con las especies presentes en el líquido de análisis.

Como podemos observar en las imágenes de la figura 3.1, estos materiales presentan características estructurales muy variadas. Se puede apreciar que el W1 y la FA presentan una estructura muy similar, con un entramado de fibras muy irregular y unos tamaños de poro muy pequeños. Por otro lado, la NC presenta una estructura porosa de tipo esponja muy uniforme con poros de unas pocas micras. Por último, se puede observar que la FV está compuesto de un entramado de fibras muy finas y tubulares dispuestas de manera que constituyen es un material extremadamente poroso.

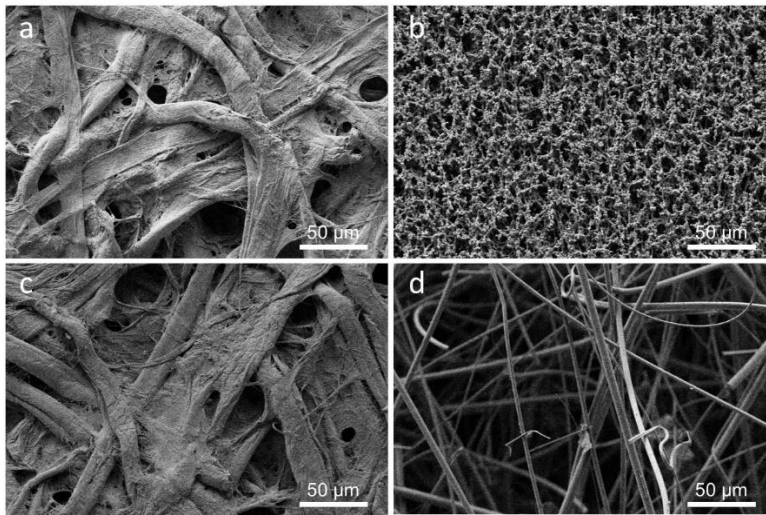


Figura 3.1. Imágenes SEM de los papeles más usados en los (e)PADs (a) W1, (b) NC, (c) FA y (d) FV.

La gran diferencia entre tamaños y estructura de los poros que se observa en las imágenes SEM de estos materiales hace prever diferencias en la difusión de una especie química embebida en estos diferentes substratos en disolución (D_A). Este factor resulta relevante, ya que como se ha descrito en el capítulo 2, el parámetro D_A tiene un efecto directo en la magnitud de la respuesta

electroquímica; cuanto menor es D_A , menor es la corriente, lo que impacta en la sensibilidad y en el LOD de un ePAD.

Una manera de obtener el valor de difusividad de una especie electroactiva en un material poroso es mediante la realización de una cronoamperometría (CA) a un potencial en el que la respuesta esté controlada por difusión. Así, se procedió a comparar la respuesta electroquímica por CA generada por la oxidación de 1 mM de ferricianuro en KCl 0.1M como electrolito soporte a un potencial de -0.2V vs Ag/AgCl en un SPE en ausencia y presencia de un sustrato de papel. Previamente, nos cercioramos de que a ese potencial la medida electroquímica estuviese controlada por difusión.

En el primer caso, se depositó una gota de la solución de ferricianuro de 50 μ L, que es un volumen lo suficientemente grande como para cubrir los tres electrodos del SPE. En el segundo caso, se depositó sobre el SPE un trozo de papel de W1 circular de radio 1 mm, que es lo suficientemente grande como para cubrir los electrodos, y se impregnó con la solución de ferricianuro. En la figura 3.2a podemos ver los resultados obtenidos. Se puede apreciar como las corrientes registradas a partir de los primeros segundos son distintas, siendo la medida en el papel de menor magnitud que en la gota del fluido. Tal y como podemos deducir de la ecuación 2.12, la disminución de corriente podría deberse a que al entrar en contacto el sustrato de papel con la superficie del electrodo, su área efectiva disminuya y por lo tanto también la corriente generada. Por otra parte, cabe la posibilidad de que la difusión del ferrocianuro se vea disminuida debido a la baja porosidad del papel. Es también posible que la disminución de corriente se deba a una combinación de ambos efectos. Con el objetivo de discernir el origen de la disminución de la señal en el sustrato poroso, se procedió a representar los datos en distintos formatos.

Generalmente, la representación de la respuesta obtenida en una CA en electroanálisis se representa en función de $t^{-1/2}$. Si la medida está controlada únicamente por difusión y la difusión es igual en todo el rango, la respuesta es

lineal (ver apartado 2.1). En la figura 3.2b se puede observar como la respuesta en gota es completamente lineal en todo el rango de medida, tal y como cabe esperar para una respuesta cottrelliana. Sin embargo, observamos que, en presencia del sustrato de papel, la respuesta se desvía de esa tendencia a tiempos que podemos considerar relativamente largos dentro de la duración típica de una CA. Este desvío nos indica que la respuesta no está controlada, al menos, por una única difusión en todo el rango de medida. Pudiéndose ver afectada por los poros del papel después de un cierto punto.

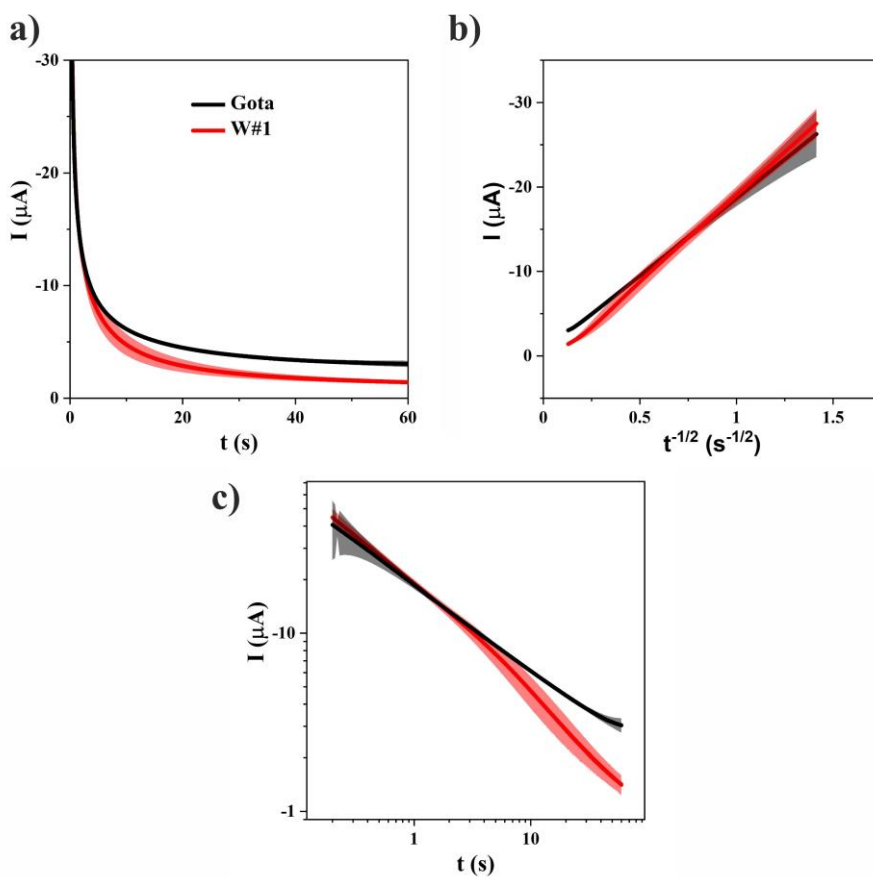


Figura 3.2. Respuesta cronoamperométrica de 1 mM de ferricianuro a -0.2V vs Ag/AgCl en KCl 0.1M en un SPE medido en una gota (negro) o en papel W#1 impregnado. a) representación en escala lineal; b) representación en $t^{-1/2}$; c) representación en escala log-log.

En el capítulo 2 se discute el interés de representar la CA en forma doble logarítmica para evidenciar qué fenómenos difusivos se producen en el sistema. En esta representación, si la pendiente obtenida es 0.5, sabemos que la transferencia de masa está controlada totalmente por difusión con un único valor de D_A y por lo tanto es de tipo cottrelliana. Así pues, la figura 3.2c muestra una representación en escala doble logarítmica de las corrientes obtenidas. En concordancia con la representación de $t^{-1/2}$, la respuesta obtenida en la gota de líquido confirma la dependencia cottrelliana y presenta una única pendiente cuyo valor es aproximadamente 0.5. Cabe destacar, que, en los últimos instantes de la medida, esta respuesta se desvía ligeramente de 0.5 hacia valores positivos, algo esperado teniendo en cuenta que a tiempos relativamente largos puede aparecer un efecto de convección natural. En cambio, en el caso de la presencia de W1 se observa la aparición de dos zonas con pendientes distintas. En un primer lapso (que abarca los primeros dos segundos), los valores de intensidad obtenidos coinciden con los registrados en la gota, mientras que posteriormente la respuesta logarítmica cambia de pendiente y se desplaza hacia corrientes más bajas. Esto indica que en un primer momento la presencia del papel no interfiere en la respuesta del SPE (por lo que queda descartada una disminución del área activa de los electrodos). Después de los primeros segundos, la respuesta se desvía a corrientes menores, lo que indica un efecto de la presencia del sustrato poroso del papel que sólo puede deberse a un cambio en la difusividad del ferrocianuro.

Cabe destacar, que la existencia de dos pendientes distintas parece indicar que existe una transición desde una zona no tortuosa (y por tanto con difusividad idéntica a la que se obtiene en un fluido libre) a una zona con tortuosidad. Esta idea está representada esquemáticamente en la figura 3.3a, donde se han dibujado las dos regiones: (1) una zona muy fina entre la superficie del electrodo y las primeras fibras del papel y (2) la matriz del papel en sí.

En un medio poroso, como el de un sustrato de papel, el coeficiente puede verse afectado debido a un aumento de la distancia que una molécula debe recorrer

entre dos puntos respecto al caso del fluido libre El coeficiente de difusión en un medio poroso se puede expresar como:

$$D_{ef} = \frac{\varepsilon}{\tau} D_0 \quad (\text{ec. 3.1})$$

Donde ε y τ son la porosidad y la tortuosidad respectivamente y D_0 el valor del coeficiente de difusión en una matriz libre de poros. Se han desarrollado múltiples técnicas para determinar la porosidad y la tortuosidad de una membrana para aplicaciones electroquímicas. La complejidad de estas técnicas, la ausencia de una estandarización de las medidas y las diferencias en los valores reportados entre ellas, hace que obtener los valores experimentales de estos parámetros sea extremadamente complicado [78]. Estos valores se podrían determinar mediante porosimetría de mercurio, en la cual se inyecta mercurio por intrusión a alta presión para determinar el diámetro del poro o el volumen total del poro de un material. Sin embargo, esta técnica no se puede usar en materiales basados en papel debido a que podría destruir su estructura. El análisis por BET (de Brunauer–Emmett–Teller, los impulsores de esta técnica) es una técnica ampliamente usada para determinar los poros de un material. En esta técnica se determina la porosidad de un material por adsorción de N_2 líquido a baja temperatura. Sin embargo, únicamente se puede determinar para escalas nanométricas, escalas mucho menores que los materiales de este estudio. Por lo tanto, debido a la imposibilidad de realizar una medida experimental que nos permita determinar los valores de ε y τ de manera independiente, usaremos el valor de coeficiente de difusión en medios no tortuosos, que denominaremos D_0 , y el valor de coeficiente de difusión en medios tortuosos, que denominaremos D_{ef} , siendo posible establecer una relación experimental entre ellos que corresponderá al coeficiente $\frac{\varepsilon}{\tau}$.

Por último, cabe destacar que el grosor de los materiales estudiados es mucho más bajo (entre 120 y 350 μm) que la altura de una gota de una solución acuosa que cubra una superficie del mismo diámetro. La existencia de espesores tan delgados puede generar respuestas electroquímicas de tipo capa-fina. Es decir,

situaciones en las que el perfil de difusión alcanza el grosor de la capa de fluido y por tanto el aporte de especies desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo disminuye de manera significativa, haciendo que la respuesta amperométrica caiga abruptamente.

Con el objetivo de comprender y analizar las respuestas electroquímicas obtenidas con los diferentes sustratos elegidos se ha construido un modelo que permite simular la respuesta de un SPE en diferentes entornos. Para ello, se ha hecho uso de un programa que permite la modelización de sistemas físicos mediante el método de elementos finitos (COMSOL Multyphysics®). En la figura 3.3b, se ha representado el modelo geométrico, así como las distintas condiciones de contorno impuestas. La geometría circular del SPE empleado experimentalmente permite trabajar con un modelo de representación 2D axisimétrico, lo cual simplifica el tiempo de cálculo computacional y se obtienen resultados más precisos. Las dimensiones del modelo se han fijado siguiendo las indicaciones reportadas para este tipo de simulaciones [56]. La longitud radial mínima del modelo en un sistema semi-infinito debe ser mayor que el movimiento browniano que pueda tener lugar durante el lapso que se quiera simular. Por lo tanto, la distancia máxima (r_{max}) del eje radial se ha establecido como:

$$r_{max} = r_e + 6\sqrt{D_0 t_{max}} \quad (ec. 3.2)$$

donde r_e es el radio del SPE i t_{max} el tiempo máximo de duración de la medida. Mientras que en el eje z, se ha establecido la altura a un valor de $6\sqrt{D_0 t_{max}}$ en la simulación de una gota de fluido o un valor correspondiente al grosor del sustrato de papel a estudiar.

El modelo se ha parametrizado de manera que permita simular las diferentes casuísticas de interés. Para ello, se ha definido dos zonas en las que se pueden definir coeficientes de difusión distintos: una primera zona directamente en contacto con el electrodo y de unos pocas μm de grosor y una segunda zona que comprende el resto del espacio físico del modelo. De esta manera, para

simular un sistema cottrelliano homogéneo, basta con definir un único coeficiente de difusión en ambas zonas, mientras que coeficientes de difusión distintos permiten simular la transición entre zonas de tortuosidades y porosidad distintas. Finalmente, el efecto de capa fina puede simularse disminuyendo la altura del modelo (h_{papel}) hasta observar la aparición de una caída abrupta de la intensidad.

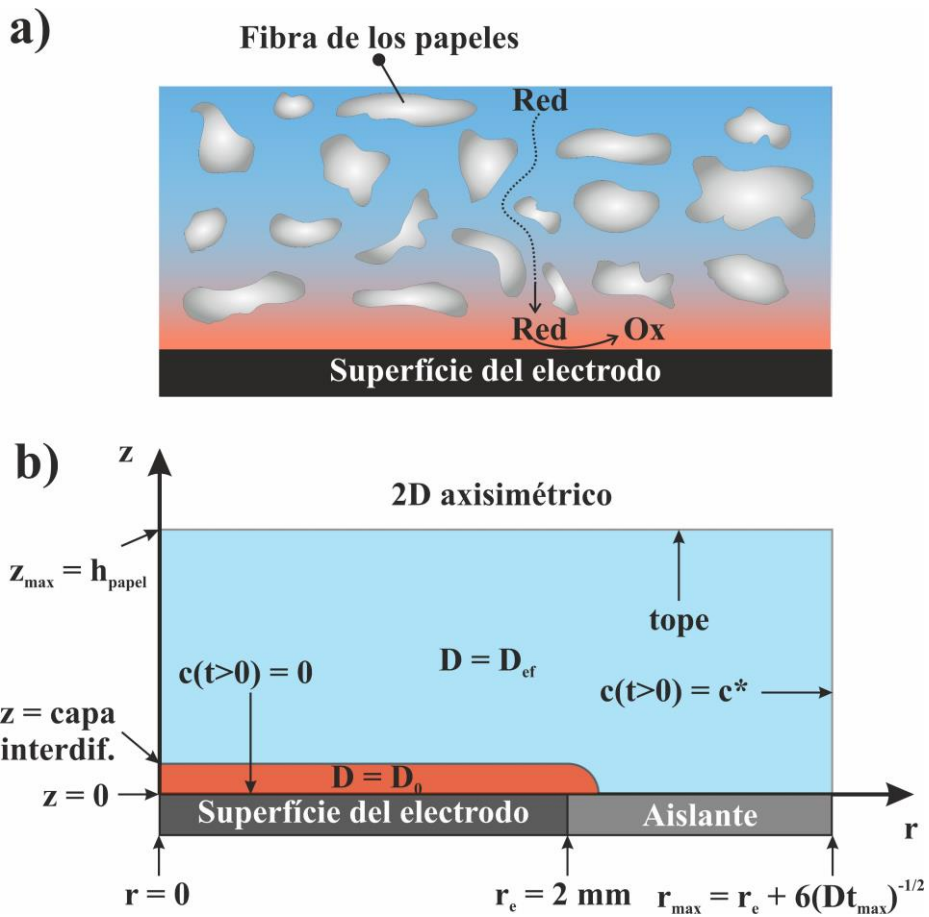


Figura 3.3. Representación gráfica de los regímenes difusivos dentro de un papel poco poroso. a) Esquema visual; b) Modelo teórico

La tabla 3.1 resume los valores empleados en la simulación de los distintos entornos. Para la simulación de un medio no poroso (libre) se ha escogido un valor de D_0 típico para un ion en una disolución acuosa salina, $6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, mientras que, para emular un material poroso respecto a uno libre, se ha escogido un valor de D_{ef} 6 veces menor, $1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

Tabla 3.1. Valores empleados en la simulación de los distintos entornos.

	$D_0 / \text{m}^2\text{s}^{-1}$	$D_{\text{ef}} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$	Altura (z_{max}) / μm
Cottrelliano homogéneo	$6 \cdot 10^{-10}$	-	Semi-infinito
Cottrelliano homogéneo	$1 \cdot 10^{-10}$	-	Semi-infinito
Sistema de capa fina	$6 \cdot 10^{-10}$	-	150
Sistema de dos regímenes difusivos	$6 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-10}$	300

Los resultados obtenidos en las diferentes simulaciones se han representado a escala lineal y a escala logarítmica en las figuras 3.4a y 3.4b respectivamente. Seguidamente se comentan los resultados para cada caso concreto:

- a) **Sistema semi-infinito y efecto del valor del coeficiente de difusión en la respuesta obtenida:** la capacidad de difundir de la especie electroactiva dentro de un sustrato tiene una influencia muy relevante en la corriente generada. En el caso simulado en nuestro modelo, podemos comparar la corriente obtenida cuando la especie electroactiva tiene un valor de $D_0 = 6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ y cuando tiene un valor de $D_0 = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, y vemos que los valores de corriente obtenidos

en el segundo caso disminuyen de manera significativa (figura 3.4a). En la representación en escala log-log (figura 3.4b), esto se traduce en un desplazamiento en el eje y de la recta de valores, que siguen una pendiente de 0.5 como corresponde para este tipo de sistema.

- b) **Sistema con efecto de capa fina:** Se entiende como capa fina al fenómeno en que el aporte de especies a la superficie del electrodo cesa debido a que el perfil de difusión ha alcanzado el límite físico del fluido en el que se encuentra. En el caso que nos ocupa, en el que se reproduce la corriente generada durante el primer minuto, esto se consigue fijando el coeficiente de difusión de la especie en todo el volumen a $6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ y la altura total del modelo a $150 \text{ }\mu\text{m}$. Si comparamos los valores obtenidos en la representación lineal (figura 3.4a) de este sistema con el sistema semi-infinito con el mismo valor de coeficiente de difusión simulado en el primer caso, vemos que durante los primeros 10 segundos la respuesta amperométrica de ambos sistemas es idéntica. Esto es debido a que el perfil de difusión todavía se encuentra muy cercano al electrodo. En cambio, entorno a los 10 segundos, la capa de difusión alcanza el límite del modelo, lo cual se traduce en una disminución acusada de la corriente. Este efecto se percibe aún más claramente en la representación log-log. Cabe destacar que incluso a tiempos largos, la corriente no se extingue del todo como debería esperarse al producirse el agotamiento total de las especies en el eje vertical debido a una contribución de especies axial modelizado en nuestro sistema.
- c) **Medio con porosidad variable en z:** por último, se ha procedido a la simulación con dos regímenes difusivos, desde uno con $D_0 = 6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ en los primeros $40 \text{ }\mu\text{m}$ de grosor a uno con un valor de coeficiente de difusión menor, para simular uno tortuoso, con $D_{\text{ef}} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Los valores de coeficientes de difusión elegidos son los mismos que en el apartado a. En este caso, mientras que en la escala lineal las corrientes generadas son muy similares, la representación en la escala

log-log nos muestra que, a partir del primer segundo, la corriente experimenta una disminución durante un periodo de aproximadamente 10 segundos para posteriormente recuperar la pendiente de 0.5 esperable de un sistema cottreliano, pero con valores de intensidad menores. Este resultado parece indicar que el sistema transita desde una situación en la que el aporte de especies proviene únicamente de la capa de interdifusional a uno en que el aporte proviene únicamente de la capa superior del modelo. Entre estos dos regímenes, existe un periodo de transición en el cual el perfil de difusión se encuentra entre las dos zonas y el sistema se encuentra parcialmente limitado en corriente debido a que el aporte de especies de las dos capas es distinto debido a las diferencias de difusividad de los dos medios.

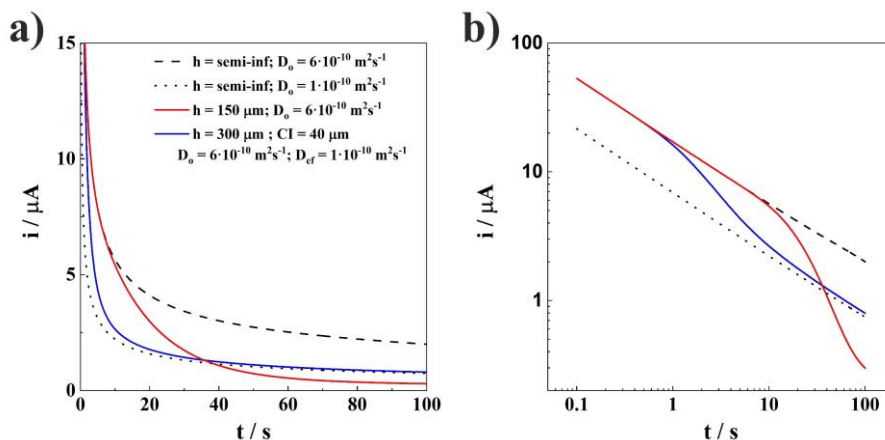


Figura 3.4. **Resultados de las simulaciones de CA en diferentes regímenes difusivos. El modelo geométrico de las simulaciones está representado en la figura 4.4b y los valores de los diferentes parámetros están dentro de la leyenda de la figura. a) resultados a escala lineal; b) resultados a escala logarítmica**

Una vez realizada la modelización de los diferentes fenómenos de difusión y sus efectos en la corriente generada en un electrodo, se llevaron a cabo medidas de CA con 1 mM de FcMeOH en 0.1M de NaCl como electrolito soporte en un SPE y en presencia de los distintos sustratos de estudio: W1, NC, FA y FV. El FcMeOH es un compuesto redox ampliamente usado en las caracterizaciones

electroquímicas de distintos sistemas debido a que es una especie de esfera externa y con carga eléctrica neutra. Cada papel se impregnó con la cantidad de solución acorde con su capacidad de absorción de agua y según especificaciones del fabricante (ver sección de materiales y métodos de este capítulo). En la figura 3.5a y 3.5b se representan las corrientes obtenidas en escala lineal y logarítmica respectivamente.

En primer lugar, en la figura 3.5a observamos un comportamiento casi idéntico para los materiales basados en celulosa (W1 y FA) siendo las corrientes generadas en ambos casos las más bajas de todas las registradas. Por el contrario, la fibra de vidrio (FV) presenta la mejor respuesta amperométrica. Este experimento muestra de manera muy sencilla que la elección del material usado en un ePAD influye de manera evidente en la señal electroquímica. La representación logarítmica de los datos nos permite deducir algunos aspectos interesantes.

El sustrato FV presenta una respuesta puramente cottrelliana en todo el rango de medida. En el caso de la NC, la respuesta es, también, cottrelliana y muy similar a la obtenida con la fibra de vidrio durante los primeros 10 segundos. Después, la corriente empieza a decaer de manera abrupta. Este fenómeno parece atribuible al efecto de capa fina anteriormente descrito y que tendría lugar debido al bajo grosor de este material en comparación con el resto. En este caso, observamos que, aunque es un material con un tamaño de poro mucho menor que el de la fibra de vidrio, la disposición de las fibras no modifica la difusión del FcMeOH . En los sustratos de celulosa (FC y W1), en cambio, lo que se observa, es que los dos sistemas parten de una respuesta muy similar a la observada en los demás sustratos y experimentan una disminución de la corriente a partir del primer segundo. Después de un periodo de transición, la pendiente log-log recupera el comportamiento cottrelliano, lo que como se ha explicado anteriormente, corresponde al paso a un material donde la especie estudiada difunde con mayor dificultad (material más tortuoso). Es decir, los

materiales de celulosa presentan dos zonas diferencias en difusividad al ser caracterizadas sobre un electrodo SPE.

Para confirmar las hipótesis que explican los resultados obtenidos, se llevaron a cabo ajustes mediante iteraciones del modelo axisimétrico presentado en la figura 3.3b haciendo uso del programa COMSOL Multiphysics. La metodología sobre estos ajustes por iteraciones se encuentran descritos en la bibliografía [79]. En este caso, los ajustes del modelo para reproducir los datos experimentales nos permiten extraer los valores del coeficiente de difusión de la especie estudiada en las diferentes zonas, así como de la distancia a partir de la cual existe un cambio dentro del material, ya sea porque aumenta la tortuosidad o por que la capa de difusión ha alcanzado el grosor del material y por tanto el régimen cottrelliano se abandona.

Los datos obtenidos de los ajustes del modelo se encuentran superpuestos a los resultados experimentales en las figuras 3.5a y 3.5b. Como podemos apreciar, los datos obtenidos por simulación muestran un alto grado de concordancia en todos los casos, confirmando así que las hipótesis modelizadas explican el comportamiento descrito. El valor de la difusión encontrado en FV y NC ha sido en torno a $5.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, valor muy similar a los reportados para este compuesto en un medio acuoso [79]. Esto indica que el uso de estos materiales en un ePAD no altera la respuesta cronoamperométrica respecto a la que se obtendría en un medio acuoso. En los ajustes realizados para los sustratos de celulosa W1 y FA, el valor de la difusión en la capa existente entre electrodo y matriz porosa (etiquetado como CI en la figura 3.4b) también corresponde a valores similares a los de un medio acuoso. La altura de esta capa es de alrededor de $50 \text{ }\mu\text{m}$, mientras que los valores de D_{ef} , es decir, de la difusión dentro de la matriz de celulosa, fueron de $1.2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ para la celulosa W1 y $1.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ para la FA. Mediante las diferentes simulaciones realizadas en el trabajo, se ha podido determinar el grosor mínimo de la NC y del W1, ya que, si se introducía en el programa el valor en seco reportado por el fabricante, se observaba capa fina a tiempos finales, mientras que no era observado

experimentalmente. Por lo que se ha podido determinar que el valor mínimo del grosor de la NC es de 150 μm y de 210 μm para el W1.

Con el fin de averiguar si alguno de los sustratos presenta algún efecto electrostático, se realizaron los mismos experimentos, pero con un compuesto electroquímico cargado. Para ello, se escogió el ferricianuro, un compuesto de carga negativa y, que a pesar de ser de esfera externa es también ampliamente usado en caracterizaciones electroquímicas debido a su buena actividad intrínseca. Las condiciones experimentales (SPE, concentraciones de especie redox y electrolito soporte) fueron las mismas que las usadas en la caracterización del sistema con el FcMeOH. Los resultados obtenidos están representados en las figuras 3.6c y 3.6d. Los ajustes por simulación también se encuentran superpuestos.

Puede observarse que las respuestas obtenidas en los diferentes sustratos son muy similares a los del caso anterior: un único régimen cottreliano para el sustrato FV, una respuesta de tipo capa-fina en la NC y transición entre dos regímenes de difusión en los casos del W1 y el FA. La única diferencia que podemos apreciar en este caso es que, entre estos dos últimos sustratos, los valores de corriente obtenidos son más bajos en la FA que en el W1. Esto indica que el ferricianuro experimenta mayor dificultad para difundir en la FA. Si nos fijamos en los valores de D_{ef} obtenidos una vez realizado un ajuste de los resultados en el modelo de simulación (tabla 3.2), vemos como las diferencias entre FA y W1 para cada caso son mayores al usar una especie cargada negativamente que cuando usamos una especie con carga neutra. Eso es debido a que el papel de algodón está cargado negativamente en su superficie, lo que genera una cierta repulsión con la especie cuando pasa a través de sus fibras. Este efecto es mayor en el sustrato FA. El valor obtenido de D_0 para el ferrocianuro está entre los valores reportados en la literatura [79].

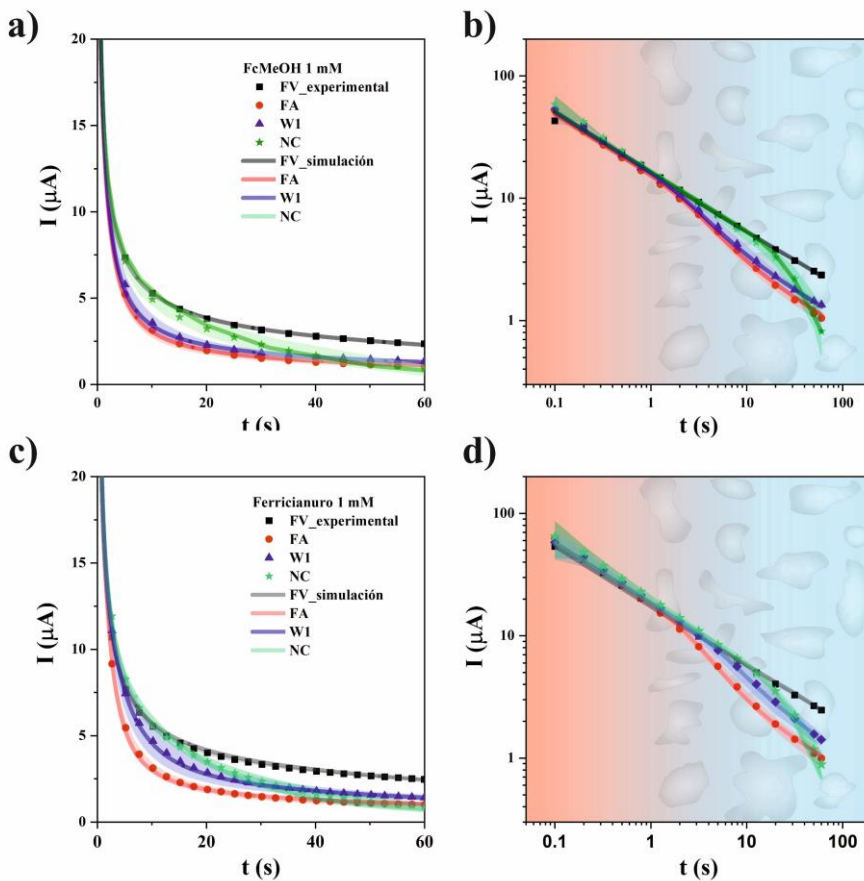


Figura 3.5. Valores experimentales y de las simulaciones de las CA obtenidas en 1 mM de FcMeOH y en 1 mM de ferricianuro en los distintos papeles: W1, NC, FA y FV. a) CAs del FcMeOH en escala lineal; b) CAs del FcMeOH en escala logarítmica; c) CAs del ferricianuro en escala lineal; d) CAs del ferricianuro en escala logarítmica.

Tabla 3.2. Valores de D_0 , D_{ef} , CI y grosor de los papeles obtenidos una vez realizado un ajuste de los resultados en el modelo de simulación

	Material	$D_0 \cdot 10^{-10} /$ m^2s^{-1}	$D_0 \cdot 10^{-10} /$ m^2s^{-1}	CI / μm	Grosor / μm
<i>FcMeOH</i>	FV		-	-	355
	FA	5.5	1.2	50	340
	W1		1.6	50	<210
	NC		-	-	<150
<i>K₃[Fe(CN)₆]</i>	FV		-	-	355
	FA	7.0	1.2	60	340
	W1		2.2	85	<210
	NC		-	-	<150

Con el objetivo de ilustrar de manera visual los diferentes fenómenos descritos en este capítulo, en la figura 3.6 se han representado los diferentes gradientes de concentración de ferricianuro creados en los distintos sustratos de papel a distintos tiempos de la medida CA.

En primer lugar, observamos que el perfil de concentraciones obtenido para FV es el esperado para un sistema con un coeficiente de difusión homogéneo. A los 50 segundos, el perfil de difusión se encuentra cerca del límite superior del material, aunque los datos experimentales no reflejan todavía una limitación en corriente. Sería de esperar que, a tiempos más largos, la corriente experimentara una caída brusca. Este efecto se observa claramente en el sustrato NC, en el que entre el segundo 10 y el segundo 50, la concentración de ferricianuro decae drásticamente debido a que prácticamente todas las especies situadas en la dirección vertical se han consumido. En cambio, en la dirección radial, el perfil

de difusión no ha alcanzado el límite del modelo, cosa que genera un aporte axial de especies responsable de la corriente residual observada en la CA.

Respecto a los materiales con dos perfiles de difusión distintos (identificados en la figura 3.6 por una línea discontinua), los sustratos W1 y FA, se puede observar cómo inicialmente el gradiente de concentración aumenta muy rápidamente hasta que al llegar a la segunda zona – correspondiente a la matriz porosa de celulosa - avanza de manera más lenta. Tal y como han indicado los ajustes, este efecto es más acusado en el sustrato FA.

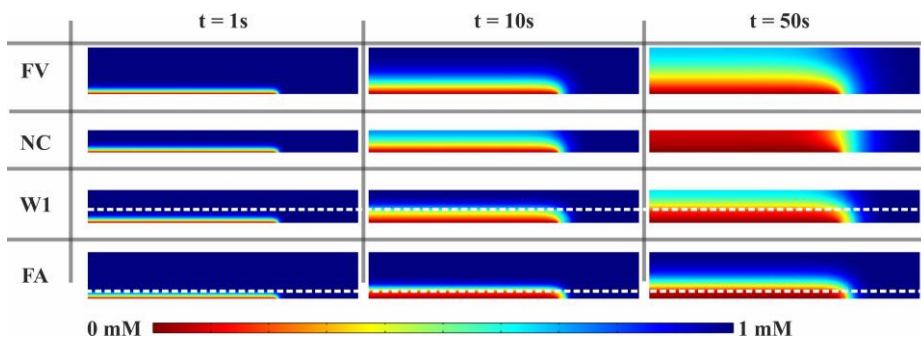


Figura 3.6. Simulaciones en COMSOL de la distribución de la concentración en el seno de distintos papeles en una medida de CA en 1 mM de ferricianuro

3.3 Conclusiones

Las investigaciones publicadas hasta la fecha respecto a los PADs o ePADs se han centrado en la búsqueda de las distintas aplicaciones que pueden aportar estos dispositivos. También se han publicado numerosos estudios en los que se investigan las características fisicoquímicas del papel o de los electrodos. Pero no existen trabajos que analicen qué efecto puede tener la selección del material poroso en la respuesta electroquímica del sistema.

En este capítulo se han llevado a cabo diferentes medidas por CA de dos compuestos electroactivos, FcMeOH y ferricianuro, en distintos sustratos de papel ampliamente usados en la industria del diagnóstico.

- La FV permite obtener una respuesta muy similar a la de un medio acuoso durante el tiempo de medida efectuado y para las dos especies redox estudiadas. La estructura de este material, compuesto por fibras delgadas y muy separadas entre sí, le confiere una alta porosidad que permite una difusión prácticamente idéntica a la obtenida en ausencia de papel. A modo de conclusión, podemos afirmar que, desde el punto de vista del comportamiento electroquímico, este material es altamente recomendable para la implementación de ePADs.
- La NC, aunque presenta una estructura en forma de esponja de poros mucho menores que la fibra de vidrio, también muestra un comportamiento muy similar a ésta a tiempos cortos. No obstante, pasados los primeros 10 segundos del inicio de la medida, la corriente registrada decae de manera significativa. Esto es debido a que la capa de difusión alcanza el grosor del material, que posee tan solo 150 micras. Este material resulta clave en los ePADs destinados a inmunosensado, ya que estructura permite el anclaje de biomoléculas usadas para el reconocimiento del analito. Como conclusión, podemos afirmar que, si no se puede prescindir del uso de este sustrato y se

quiere mantener una sensibilidad óptima, las medidas cronoamperométricas deberían realizarse durante los primeros segundos después de la aplicación del potencial de trabajo.

- En los materiales de celulosa estudiados - W1 y la FA – en los cuales los poros presentan una distribución de tamaños muy irregular, se ha observado la existencia de dos zonas con comportamientos difusivos distintos. La primera zona, correspondiente a la región más cercana al electrodo, la respuesta es muy similar a la de un medio acuoso. Una vez superada esta primera zona, que posee un grosor aproximado de 50 micras, encontramos una segunda zona en la que la difusión disminuye de manera apreciable y, por lo tanto, después del primer segundo de medida, la corriente generada disminuye significativamente. Como conclusión, cabe destacar que, aunque el uso de W1 en ePADs ha sido ampliamente reportado, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que este material no resulta la mejor elección si quiere obtenerse una buena señal electroquímica.

El estudio presentado en este capítulo pretende poner en el punto de mira la necesidad de caracterizar la respuesta electroquímica de los sustratos de papel que quieran usarse en el desarrollo de un ePAD para así evitar un deterioro de la sensibilidad y el límite de detección del sensado electroquímico respecto a la caracterización en líquido, que suele ser uno de los pasos previos a la integración en papel. Curiosamente, los resultados obtenidos con cuatro sustratos de amplio uso en la industria del diagnóstico muestran que el más usado por sus características microfluídicas y por razones históricas, no resulta el más adecuado para la lectura electroquímica.

3.4 Materiales y métodos

Reactivos y electrodos

El ferrocenmetanol (FcMeOH, General Reagent, 97%), el hexacianoferrato potásico de hierro (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$, BioUltra, >99%) y el cloruro de sodio (NaCl, BioXtra, >99.0%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las concentraciones finales de las disoluciones fueron de 1 mM de ferrocianuro o FcMeOH en 0.1 M de NaCl. Los electrodos serigrafiados (Modelo 110, Dropsens, España) tenían un electrodo de trabajo de pasta de carbono de 4 mm, un pseudoelectrodo de referencia de pasta de Ag/AgCl y un contra electrodo de pasta de carbono. Los papeles empleados fueron la celulosa 238 (FA, Ahlstrom, Munksjö, Helsinki, Finlandia), la fibra de vidrio (FV, Whatman Std. 14, Cytiva, Marlborough, EE.UU., $50.9 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$), la nitrocelulosa (NC, FF80HP, Cytiva, Marlborough, EE.UU.), y el papel cromatográfico Whataman #1 (Cytiva, Marlborough, EE.UU.).

Análisis por elementos finitos

Se ha usado la interfaz física denominada “*Electroanalysis*” del Software COMSOL Multiphysics® (V5.6, Estocolmo, Suecia) para resolver numéricamente las ecuaciones diferenciales parciales del transporte de materia. Los estudios se realizaron haciendo uso de un modelo 2D axisimétrico. Las simulaciones se realizaron en un ordenador Intel® con un procesador Xenon® E5-1620 (SI.70 GHz). Para obtener los valores por iteraciones se hizo uso del módulo “Optimization”. Para más información respecto a este módulo acudir a la bibliografía [79].

Medidas electroquímicas

Las medidas cronoamperométricas se realizaron en un potencióstato Autolab PGStat 302N (Metrohm, Herisau, Suiza) equipado con el software Nova 2.1. Las medidas realizaron durante 60 segundos a unos potenciales de 0.3V y -0.2V

respectivamente. Los papeles se recortaron en forma de círculo con un radio de 5.0 mm con la ayuda de un láser de CO₂ (Mini 24, Epilog Laser, Golden, Co, EE.UU.). Los papeles se depositaban encima de los SPE añadiendo una cantidad de disolución requerida para saturar los papeles según las especificaciones obtenidas por el fabricante. En ausencia de papeles, las medidas se realizaron añadiendo una gota de 50 µL directamente encima de los tres electrodos del SPE. Todas las medidas se realizaron por triplicado (n = 3). Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar. Antes de realizar las medidas, los SPE se activaron electroquímicamente alternando 1.5 V y -1.5 V durante 30 segundos. Seguidamente, los electrodos se limpiaron con agua destilada y secado con una pistola de aire.

4 Desarrollo de un inmunosensor autoalimentado

Capítulo 4: Desarrollo de un inmunosensor autoalimentado

4.1 Introducción

La lectura de la señal electroquímica en un ePAD requiere de la implementación de una electrónica en el dispositivo y una fuente de alimentación (generalmente una pila primaria), lo cual conlleva un impacto medioambiental negativo, especialmente en dispositivos de un solo uso. Es por ello, que a nivel de investigación se están explorando alternativas más sostenibles que las fuentes de alimentación convencionales (pilas AAA o de botón) como las baterías de flujo redox basadas en compuestos orgánicos y biodegradables [80], pilas primarias de metal-aire impresas en papel [81,82] y distintos tipos de celdas de combustible, generalmente bacterianas [83] o enzimáticas [84].

Cuando la fuente de energía es de tipo celda de combustible enzimática, es posible fusionar el sensor electroquímico y la fuente de alimentación en un solo elemento. El caso más estudiado es la generación de energía directamente a partir de la oxidación de la glucosa, tanto para aplicaciones in-vitro como para dispositivos implantables [85,86]. En estos casos la glucosa es la que genera la energía del sistema, siendo la concentración del combustible y a su vez analito directamente proporcional a la energía generada. Esta estrategia ha sido demostrada también con el colesterol, el lactato y el etanol [85,86] y se denomina detección autoalimentada. En estos sistemas, la celda se completa con un electrodo complementario no limitante, de manera que la potencia generada depende de la concentración del analito en cuestión.

La detección autoalimentada en el campo del biosensado se ha extendido hacia otras especies bioquímicas como los ácidos nucleicos [87] y biomoléculas a través de un inmunoensayo [88–91] o aptámeros [92,93]. El grupo del profesor W. Schuhmann de la Universidad Ruhr de Bochum en colaboración con el grupo del profesor J. M. Pingarrón de la Universidad Complutense de Madrid, desarrollaron en 2014 la primera celda de biocombustible controlada por una reacción anticuerpo-analito para la cuantificación de antibióticos residuales en muestras de leche [89]. Para ello, emplearon como electrodo no limitante un ánodo con lactosa oxidasa y un inmunoensayo competitivo en el cátodo en el que se reducía el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) oxidado generado por una enzima anclada al anticuerpo. Las medidas se realizaron en una celda con solución acuosa. Ese mismo año, se presentó otro estudio en el que simplificaron el sistema al realizar una celda de combustible basada en un microchip y consistía en un ánodo enzimático de glucosa como electrodo no limitante y un cátodo en el que el anticuerpo de detección, capaz de detectar N(6)-carboximetilisina (CML), estaba acoplado a una bilirubina oxidasa que actuaba de biocatalizador reduciendo O_2 [88]. Posteriormente se realizaron otros trabajos con los mismos tipos de estrategia en el que uno de los dos electrodos actuaba de limitante y basado en una celda de combustible enzimático [90–92]. Todos estos trabajos exhiben unos resultados con una alta sensibilidad y buena reproducibilidad. Sin embargo, el voltaje de salida de estos sistemas está limitado por las reacciones enzimáticas, las cuales son inferiores a 1 V, limitando así la posibilidad de alimentar módulos electrónicos que permitirían la integración de los inmunoensayos autoalimentados en dispositivos portátiles.

En este capítulo se presenta por primera vez un inmunosensor autoalimentado basado en papel capaz de generar voltajes por encima de 1.55 V en presencia de un biomarcador. A diferencia de los trabajos reportados hasta la fecha, el dispositivo propone el uso de un ánodo de magnesio como electrodo no limitante de la pila. La reacción catódica hace uso de anticuerpos marcados con

una enzima de tipo catódico – Peroxidasa de rábano (HRP) – que oxida hidroquinona (HQ) a benzoquinona (BQ) en presencia de H_2O_2 . En este sistema, la cantidad de BQ generada es directamente proporcional al biomarcador presente en la muestra. Como prueba de concepto, se seleccionó la proteína C-reactiva (CRP) en muestras artificiales. El CRP es un biomarcador de enfermedades inflamatorias y cardiovasculares, con un rango de detección de interés clínico de entre 1 y 3 $mg \cdot L^{-1}$ [94]. Este trabajo resulta un punto de partida interesante para avances en el desarrollo de ePADs autoalimentados y sus posibles implementaciones en el campo del diagnóstico.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Diseño y funcionamiento del dispositivo

Estructura y partes del dispositivo. El dispositivo está compuesto de dos partes: una semicelda anódica (figura 4.1 izquierda) y una semicelda catódica (figura 4.1 derecha). La semicelda anódica está formada por un soporte de polimetilmetacrilato (PMMA), sobre el cual se posiciona una tira de Mg de 100 μm de grosor y de dimensiones 28.5 x 2.5 mm. Esta tira está nivelada con un adhesivo sensible a la presión (PSA) del mismo grosor que cubre el resto del soporte. La siguiente capa está formada por una tira de fibra de vidrio de 340 μm de grosor (FV, el mismo que el usado en el capítulo 3) que será la que actuará material poroso (tipo papel) y alojará la solución que actuará como electrolito de la semicelda anódica (anolito). Las dimensiones de la fibra de vidrio son de 13 x 5 mm y el contacto entre este material y el Mg es de 5 x 2 mm. Esta capa está nivelada con una lámina PMMA del mismo grosor.

La semicelda catódica también está soportada por un bloque de PMMA. En el interior de este soporte se ha posicionado una capa de celulosa relativamente gruesa (1 mm) que es la que drenará la solución de análisis durante el inmunoensayo. Encima del soporte de PMMA se coloca un sistema de tres

electrodos impreso (SPE) nivelado por un PSA. El SPE está comprendido por un electrodo de trabajo de carbón de 3 mm de diámetro, un contraelectrodo de carbón y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. En la capa superior de la semicelda y justo encima de los electrodos y de la celulosa, encontramos una tira de NC de 10 x 5 mm que es donde se realiza el inmunoensayo y que se encuentra nivelada con una capa de vinilo del mismo grosor.

Si nos fijamos en el esquema del dispositivo (figura 4.1), podemos ver una serie de orificios de distintos tamaños sobre los soportes de PMMA. En los orificios más anchos se colocan imanes para facilitar el acoplamiento de las semiceldas, mientras que en los orificios menores de la semicelda anódica se fijaron unos pines, que, como se verá más adelante, tienen como función la expulsión de la celulosa del dispositivo una vez realizado el inmunoensayo.

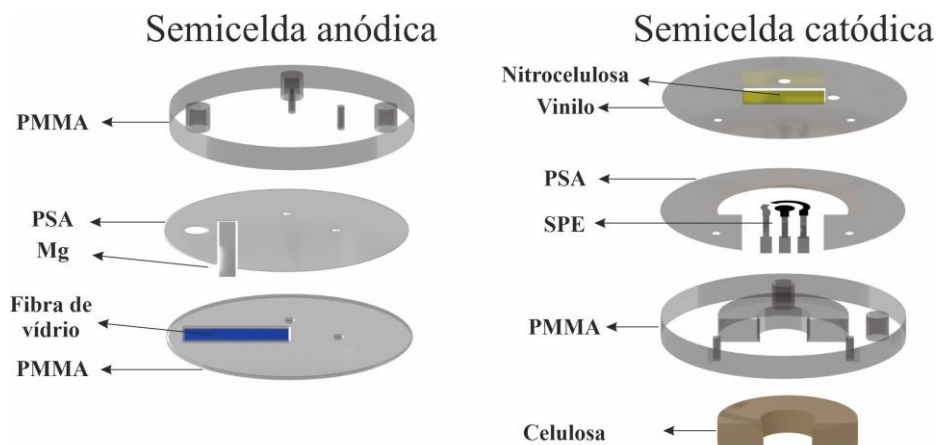


Figura 4.1. Esquema por capas de la semicelda anódica (izquierda) y la semicelda catódica (derecha)

Inmunoensayo. El inmunoensayo escogido para la prueba de concepto del sistema fue el de tipo sándwich indirecto debido a que su sensibilidad es mayor que otras alternativas y requiere una cantidad menor de anticuerpo conjugado por ensayo [95]. Todos los inmunoensayos se realizaron en la NC. El primer paso para la elaboración de un inmunoensayo es la funcionalización de la NC

con anticuerpos de captura. Según las especificaciones del fabricante, la capacidad de la NC para absorber anticuerpos es de 80 a 100 $\mu\text{g cm}^{-2}$. En el caso que nos ocupa, se añadió un exceso de anti-CRP monoclonal de cabra, en este caso 300 $\mu\text{g cm}^{-2}$, para sobresaturar la NC. Seguidamente, la NC se dejó secar en vacío durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente realizar 3 lavados con PBST para eliminar los anticuerpos sobrantes. Una vez lavados, la NC funcionalizada se almacenó en un ambiente seco.

En el momento de realizar un inmunoensayo, primero se colocó la NC sobre el SPE de manera que sus extremos estuvieran en contacto con la capa de celulosa gruesa inferior, para seguidamente realizar los pasos del ensayo, mostrados de manera esquemática en la figura 4.2. En primer lugar, se añadió a la NC la muestra artificial de CRP en PBS a la concentración deseada para cada caso. Seguidamente, se hizo añadió un anticuerpo de detección primario, Ab-d (Anticuerpo primario policlonal de rata anti-CRP), y posteriormente un anticuerpo conjugado a HRP, Ab-HRP (anticuerpo secundario antirata IgG). La optimización de las concentraciones de todos los reactivos usados en el ensayo se ha descrito en el apartado 4.2.2. Después de cada uno de los pasos descritos, se dejó incubar la NC durante 2 minutos y se realizaron 3 lavados con PBST. En el último paso, se añadió una solución de hidroquinona (HQ) y H_2O_2 (5 mM en ambos casos) dejándose incubar durante 5 minutos. Durante estos 5 minutos, la enzima HRP cataliza la oxidación de la HQ a BQ con el H_2O_2 como agente oxidante. La concentración final de BQ es proporcional a la cantidad de CRP en la muestra.

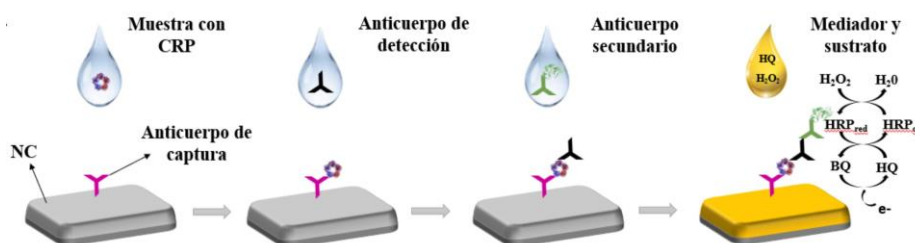
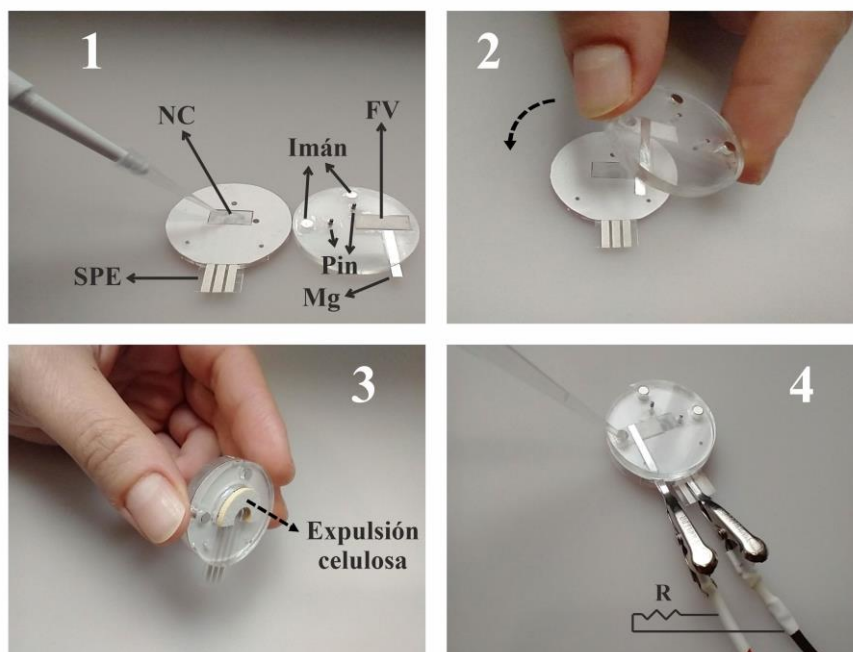


Figura 4.2. Esquema por pasos del inmunoensayo.

Funcionamiento del dispositivo. Los pasos a seguir desde la realización del inmunoensayo hasta la lectura de la respuesta se encuentran esquematizados en la figura 4.3a. En la primera imagen (figura 4.3a-1) se representa las adiciones de los pasos del inmunoensayo explicado con anterioridad. Una vez que se ha adicionado la HQ y el H_2O_2 en la semicelda catódica que constituyen el católito, la semicelda anódica se ensambla para cerrar el dispositivo (figura 4.3a-2). Los pines anclados en el ánodo permiten expulsar la capa de celulosa de la semicelda catódica que ha sido usada como drenador durante el ensayo (figura 4.3a-3). Esto permite mantener la solución de la NC aislada a nivel fluídico mientras se efectúa la incubación y evita la difusión de la BQ producida por la enzima. Además, el cierre del dispositivo evita que se evapore la muestra mientras se produce la reacción de catálisis enzimática. Por último, pasados los 5 minutos, se añade una solución de NaCl 1M sobre la fibra de vidrio mediante un orificio situado en la parte externa de la semicelda anódica. Esta solución, que actúa como anolito, es lo suficientemente conductora para evitar caídas óhmicas entre ánodo y cátodo y activar el Mg. Una vez establecido el contacto entre anolito y católito y realizada la conexión de la celda a un circuito externo, se inician las semirreacciones anódica y catódica y el sistema empieza a generar energía eléctrica (figura 4.3b).

a)



b)

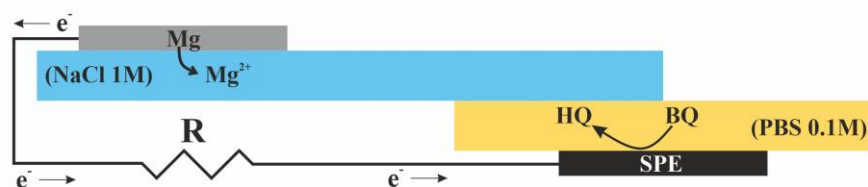
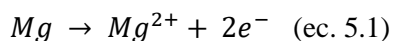
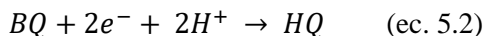


Figura 4.3. **Esquema y funcionamiento del dispositivo.** a) Imágenes de los pasos que se realizan en el dispositivo desde la realización del inmunoensayo. 1- Vista interior del dispositivo y adición de solución sobre la NC. 2- la semicelda anódica y catódica se conectan por un imán que cierra el dispositivo. 3- Los pines expulsan la celulosa. 4- Adición de electrolito en la semicelda anódica y cierre del circuito; b) Esquema lateral del dispositivo y las reacciones electroquímicas que ocurren en ella.

Reacciones electroquímicas. La pila se basa en la oxidación del Mg como reacción anódica (ec. 5.1) y la reducción de la BQ como reacción catódica (ec. 5.2):





Por lo tanto, la reacción global (ec. 5.3) es:



La ecuación de Nernst de la reacción global (ec. 5.4) queda expresada como:

$$E_{OCP} = E^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{HQ} a_{Mg^{2+}}}{a_{BQ} a_{H^+}^2} \quad (\text{ec. 5.4})$$

Como veremos más adelante, la reacción global genera un voltaje superior a 1.5V. La concentración de BQ es proporcional a la concentración de HRP en la NC que es a su vez proporcional a la cantidad de CRP presente en la muestra. Como podemos deducir de la ecuación 5.4, si aumenta la concentración de BQ, también lo hará el OCP de la reacción global. En este caso, se ha diseñado el dispositivo de tal forma que la reacción catódica sea la limitante ya que, de esta manera, toda la energía generada por el dispositivo es directamente proporcional a la concentración de CRP.

En cuanto anolito y catolito entran en contacto, los diferentes reactivos presentes en las soluciones independientes empiezan a difundir. Uno de los efectos que se quisieron evitar fue que la BQ generada en la región catódica alcanzara el ánodo de Mg y se produjera una reacción directa. Mediante el coeficiente de difusión de una especie, D_A , se puede calcular el avance (difusión) de una molécula en función del tiempo. Concretamente, la raíz cuadrada del desplazamiento al cuadrado se expresa como [56]:

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{2D_A t} \quad (\text{ec. 5.5})$$

Considerando el coeficiente de difusión reportado en la literatura de la HQ se sitúa en valores entre $5 \cdot 10^{-6}$ y $6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [96,97] y teniendo en cuenta un tiempo de medida de 60 segundos, la distancia máxima que la BQ generada en la zona catódica puede difundir es de aproximadamente 0.25 mm. Esta distancia es mucho menor que la establecida entre catolito y electrodo de Mg,

por lo que el riesgo de aparición de una reacción parásita en el ánodo debido a la BQ es prácticamente nulo.

4.2.2 Optimización de la lectura y el inmunoensayo

Previamente a la implementación del inmunoensayo en el dispositivo final detallado en el apartado 4.2.1, éste fue caracterizado y optimizado mediante un sistema electroquímico de tres electrodos, haciendo uso de los electrodos del SPE. La optimización de las concentraciones de los anticuerpos y la caracterización de la respuesta del inmunoensayo a distintas concentraciones de CRP se llevó a cabo mediante CA, ya que esta técnica es la más similar a la respuesta que electroquímica que se produce cuando se caracteriza el sistema en modo autoalimentado (formato pila) y además permite evitar los efectos de las resistencias de transferencia de carga o de doble capa.

En electroanálisis, generalmente es importante aplicar un potencial de control por difusión en las CA y así poder distinguir entre concentraciones en distintas muestras analíticas (ver apartado 2.1.2). Con el objetivo de determinar el potencial a partir del cual se establecía esta condición y a su vez estudiar la reversibilidad del sistema en las condiciones del inmunoensayo, se realizó una voltametría cíclica (CV) del par redox HQ/BQ en el SPE una vez embebido en la NC. La CV se realizó en una concentración 5 mM de HQ en PBS 100 mM a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. En la figura 4.4 se puede observar una respuesta pseudoreversible. La pérdida de la reversibilidad es debida a que la reacción electroquímica que se produce en este sistema es de esfera interna además de ser de 2 electrones y 2 protones. También hay que tener en cuenta que los SPE no son un sistema completamente ideal debido a las tintas y a la imperfectibilidad de la superficie activa del electrodo de trabajo y por lo tanto también pueden afectar a la reversibilidad del sistema. A potenciales por debajo de $-0.07 \text{ V vs Ag/AgCl}$ la reacción de reducción de la BQ está controlada por difusión. De tal forma, que, de aquí en adelante, las reacciones amperométricas

que se muestren se realizaron a -0.2V , un valor lo suficientemente alejado del valor de -0.07 que asegura que siempre haya control por difusión.

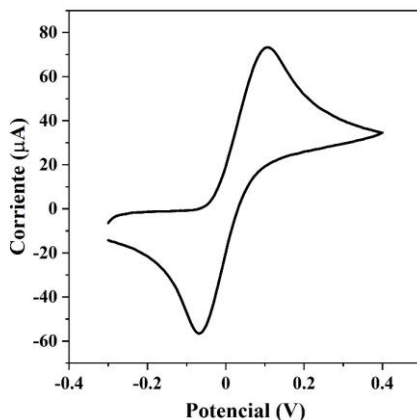


Figura 4.4. CV de 5 mM de HQ en 100 mM de PBS a $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en un electrodo SPE

Como se ha detallado anteriormente, la optimización del anticuerpo de captura no fue necesaria ya que el comerciante especificaba la cantidad suficiente para saturar la NC y simplemente se procedió a la aplicación de una solución sobresaturada seguida de diversos lavados. Sin embargo, sí fue necesaria la optimización del anticuerpo de detección y del anticuerpo secundario que hemos etiquetado como Ab-d y Ab-HRP.

Para la optimización del Ab-HRP, se incubaron en un tubo eppendorf durante 5 minutos diferentes concentraciones del anticuerpo (diluciones desde 1:4k hasta 1:128k) en 5 mM de HQ y H_2O_2 en PBS. Después de la incubación, se transfirió la disolución en la cantidad necesaria para la completa impregnación de la NC ubicada encima de los SPE y se realizó una medida de CA durante 30 segundos. En la figura 4.5a se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que entorno a diluciones de 1/8k y 1/4k la respuesta está prácticamente saturada. Para una mejor visualización y representación, en la figura 4.5b se muestra la corriente obtenida en el segundo 5 de la medida. Hemos escogido analizar los resultados a un valor de 5 segundos por varias razones. Por un lado,

cómo hemos visto en el capítulo 3, la respuesta electroquímica en una NC decae de manera significativa a partir de aproximadamente 10 segundos después de aplicar el potencial por efectos de capa fina. Por otro lado, en los sistemas controlados por difusión la diferencia entre valores de concentración es mucho más elevada a tiempos cortos, lo que aumenta la sensibilidad del sistema. En el caso que nos ocupa, hemos comprobado que a valores por debajo de 5 segundos había una relación señal-ruido muy elevada, mientras que por encima de 5 segundos existía el riesgo de perder demasiada sensibilidad. La figura 4.5b muestra la saturación de la respuesta en diluciones entre 1/8k y 1/4k. Con el fin de evitar adsorciones inespecíficas elevadas, pero manteniendo la condición de saturación, la concentración de Ab-HRP que se fijó para efectuar todos los inmunoensayos posteriores fue de 1/8k.

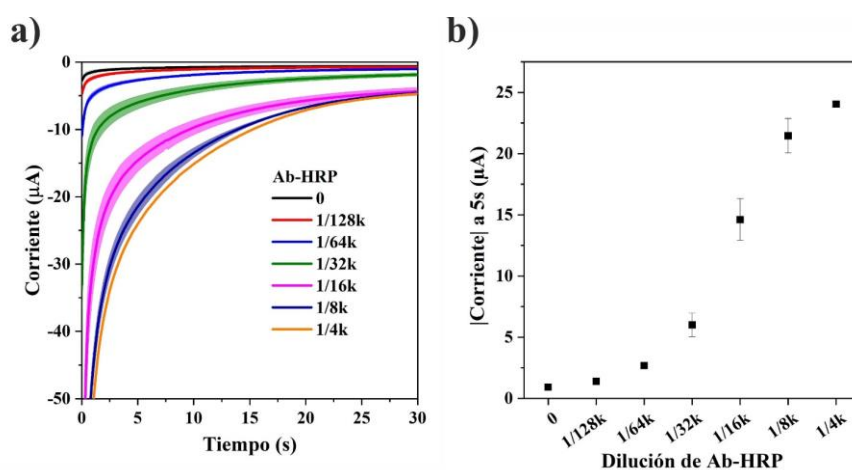


Figura 4.5. a) Respuesta CA obtenida a diferentes concentraciones de Ab-HRP (n=3); b) Corrientes obtenidas de las respuestas de CA a 5 segundos.

Una vez optimizada la concentración de anticuerpo Ab-HRP y con la NC saturada del anticuerpo de captura, se procedió a la optimización del último parámetro, la del anticuerpo de detección. Para ello, se realizó el inmunoensayo completo en ausencia de CRP ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en la concentración máxima de interés clínico ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y distintas diluciones del anticuerpo de detección,

1/1k, 1/2k y 1/8k. La BQ catalizada después de los 5 minutos de incubación para cada caso fue medida mediante CA durante 30 segundos. Como se puede apreciar en las figuras 4.6a y 4.6b, la dilución de 1/8k del anticuerpo de detección es la que genera menor diferencia de señal entre concentraciones, mientras que las diluciones 1/1k y 1/2k generaron diferencias similares. Sin embargo, la relación señal-ruido de la dilución 1/1k es de 2.4, mientras que la de 1/2k es de 2.3. Por lo tanto, la concentración escogida finalmente para el anticuerpo Ab-d fue de 1/1k.

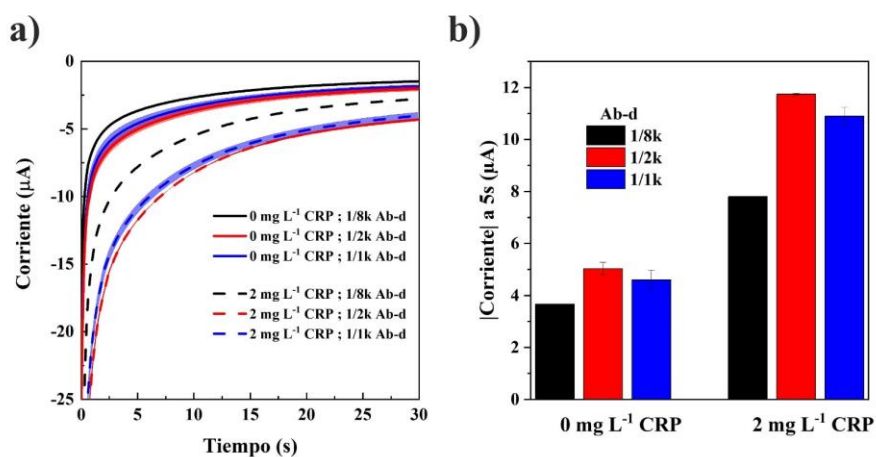


Figura 4.6. a) CA obtenidas para distintas diluciones de Ab-d y CRP. b) Corrientes obtenidas de las CA a $t = 5\text{s}$.

4.2.3 Estudio y calibración del inmunoensayo en un sistema de tres electrodos

Una vez optimizado el sistema y las concentraciones de los distintos anticuerpos se procedió a la calibración en un sistema de tres electrodos del inmunoensayo completo a diferentes concentraciones de CRP, desde 0.0625 hasta 2 mg·L⁻¹. Las medidas CA obtenidas se muestran en la figura 4.7a, mientras que en la figura 4.7b se han representado los valores de corriente

obtenidos en el segundo 5 de la medida. El ajuste matemático realizado de la curva de respuesta obtenida a diferentes concentraciones de analito se denomina regresión logística y permite obtener el límite de detección de un inmunoensayo. En este caso, el límite de detección (LOD) del ajuste ($R^2 = 0.9988$) presentó un valor de $0.066 \pm 0.003 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, calculado a través de la señal del LOD del valor de corriente ($4.3 \pm 0.1 \mu\text{A}$). Los valores obtenidos confirman que una vez optimizado, el inmunoensayo optimizado es capaz de generar señales electroquímicas que permiten detectar el CRP en los valores de concentración de interés clínico y además son comparables con otros reportados en la literatura [98].

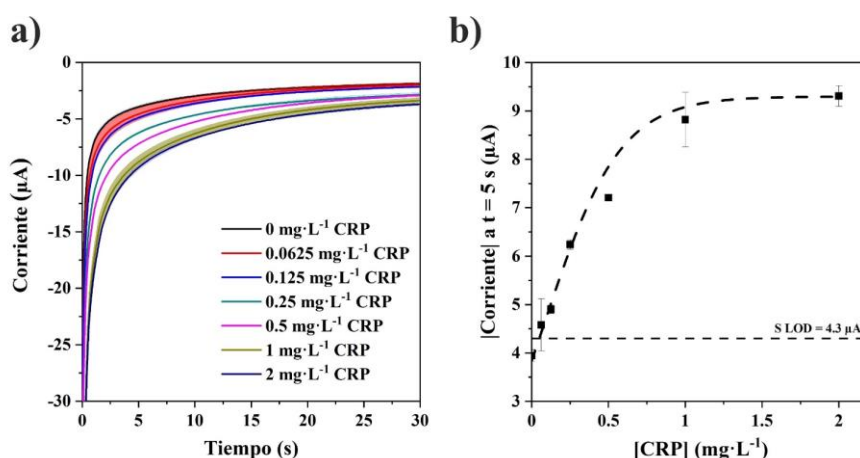


Figura 4.7. a) Respuestas CA del inmunoensayo a diferentes concentraciones de CRP. b) Corrientes obtenidas a los 5 segundos de la medida y su correspondiente ajuste matemático

Como paso previo a la integración del inmunoensayo completo en el dispositivo autoalimentado, se llevó a cabo la caracterización del ánodo y del cátodo de manera independiente. Para ello, se realizaron voltametrías lineales (LSV) en un sistema de tres electrodos. De esta forma, pudimos predecir el potencial de

circuito abierto (OCP) y analizar el comportamiento de la pila en todo el rango de potenciales.

La caracterización del ánodo se realizó utilizando la misma arquitectura que la del dispositivo final, de tal forma que la respuesta obtenida fuera lo más similar posible a la que obtendría una vez realizado el ensamblaje. Para ello, se montó el dispositivo acoplando las dos semiceldas y se usó todo el C disponible del SPE (correspondientes al electrodo de trabajo y contraelectrodo) como CE y el Ag/AgCl del SPE como electrodo de referencia. La NC situada encima del SPE se impregnó con PBS, mientras que como anolito se aplicó una solución de NaCl 1M en la fibra de vidrio. El uso de una elevada concentración de NaCl como electrolito permitió minimizar los posibles efectos de caída óhmica entre el Mg y los electrodos del SPE y a su vez facilitó la activación del Mg. La respuesta por LSV del Mg se puede observar en la figura 4.8a. Como se puede apreciar, en el rango de valores de corriente de reducción del cátodo, el potencial del Mg apenas experimenta pérdidas, manteniéndose entorno a los -1.65V vs Ag/AgCl, valor similar a los reportados en la literatura [99–101]. Esto corrobora la elección del Mg como electrodo no limitante, tal y como se requiere en nuestro inmunosensor autoalimentado.

Para la caracterización del cátodo, se incubaron varias concentraciones de Ab-HRP en una solución de HQ y H₂O₂ durante 5 minutos. Seguidamente cada solución fue transferida a una NC situada encima de un SPE y se realizó una medida por LSV a 10 mV·s⁻¹. En la figura 4.7b se pueden ver los resultados. Lo primero que observamos es que hay un desplazamiento del OCP hacia potenciales más positivos a medida que la concentración de Ab-HRP aumenta, tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.1. Después de los primeros 0.05-0.15 V de sobrepotencial de cada medida se observa el pico característico de reducción de la BQ. En torno a -0.4 V se aprecia un pico de muy baja intensidad en todos los casos, que puede ser debido o bien a diferentes polimerizaciones de la BQ o bien a restos orgánicos de las tintas de serigrafía comerciales. Por último, de -0.5 V a -0.8 V se observa otro aumento de la corriente. Este aumento

es debido a la reducción del H_2O_2 presente en la disolución y depende de la concentración de anticuerpo inicial. Es decir, cuanto menor es la concentración de Ab-HRP, y por lo tanto de BQ, mayor es la concentración de H_2O_2 residual y por tanto mayor es la corriente de reducción observada a estos bajos potenciales.

Una vez finalizada la caracterización, podemos afirmar que las caídas de potencial de los electrodos por separado indican que tal y como se requiere en el sensor autoalimentado, la reacción catódica correspondiente al inmunoensayo será la reacción limitante y que, observando los valores de los potenciales del ánodo y el cátodo por separado en un sistema de tres electrodos, el valor del OCP de la pila se encontrará en torno a 1.65V, valor muy superior a los sistemas enzimáticos reportados hasta la fecha.

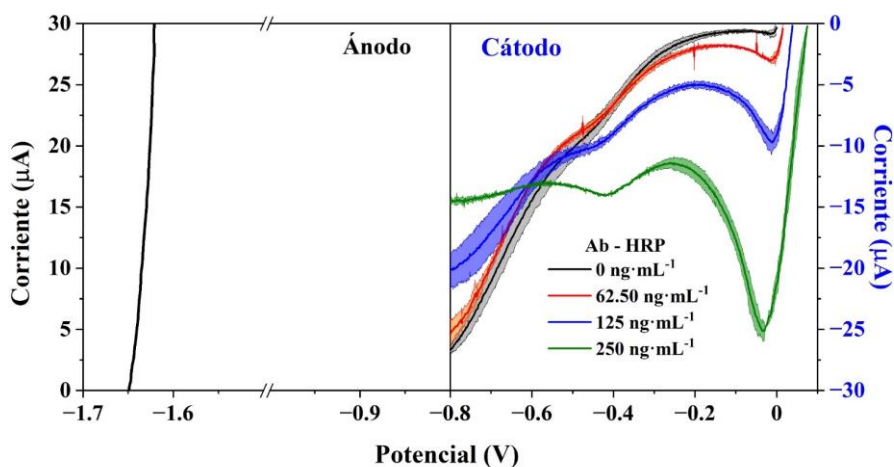


Figura 4.8. LSV a 10 mV/s del ánodo (izquierda). Caracterización por LSV del cátodo (derecha) a diferentes concentraciones de Ab-HRP.

4.2.4 Estudio y calibración del sistema autoalimentado

Previamente a la caracterización del dispositivo final (figura 4.1) como sensor autoalimentado de CRP, se procedió a la caracterización de su respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpo marcado con enzima (HRP-Ab). Para ello, se incubaron diversas concentraciones de anticuerpo junto a HQ y H₂O₂ a 5mM. En este caso, al conectar el ánodo con el cátodo, la respuesta por LSV corresponde a la suma de las respuestas del ánodo y el cátodo por separado (figuras 4.8a y 4.8b) y corresponde a lo que se conoce como curva de polarización o curva I-V de una pila de combustible. En la figura 4.9a se puede observar las curvas I-V (velocidad de escaneo de 10 mV·s⁻¹) obtenidas a diferentes concentraciones del anticuerpo Ab-HRP. Tal y como esperábamos, los valores de voltaje obtenidos corresponden a la suma de los valores de los electrodos medidos individualmente mientras que los valores de corriente generados son muy similares a los obtenidos en la medida individual del cátodo mostrados en la figura 4.8b. Los valores de OCP de la pila se sitúan ente 1.63V y 1.75V, siendo mayor el OCP a menor concentración de anticuerpo. A su vez, podemos observar que tanto el valor máximo de las intensidades medidas como la potencia máxima generada por la pila son proporcionales a la concentración del anticuerpo de la muestra, corroborando que el comportamiento del sistema corresponde al de un sensor autoalimentado.

Usando el área del cátodo para el cómputo, la potencia máxima obtenida fue de 571 μW/cm², valor muy superior a otros valores reportados en trabajos previos [88,91]. Cabe destacar que generalmente la característica I-V de una pila de combustible se realiza a velocidades de escaneo muy lentas – especialmente si la catálisis es de tipo enzimático - y se suele representar como en la figura 4.9a. Este tipo de respuesta, en la que la corriente decae pasado un punto máximo de intensidad, no se corresponde con la respuesta tradicional de las pilas de combustible diseñadas como fuentes de energía, donde la generación de

corrientes es estacionaria y controlada por la convección forzada del combustible. En los electrodos de un biosensor amperométrico, y de forma similar en nuestro sistema, la respuesta está controlada por difusión, y los valores obtenidos en la I-V de la medida son una imagen aproximada del comportamiento de la pila en cada punto de potencial. Por ejemplo, si hacemos la misma caracterización que la presentada en la figura 4.9a a una velocidad de barrido más elevada, la intensidad obtenida también sería mayor, lo que a su vez generaría un valor mayor de potencia. Así, para obtener una caracterización del comportamiento del sistema operando de manera completamente autoalimentada, se procedió a conectar una resistencia de 270 k Ω . Una vez realizada la conexión y establecido el régimen de trabajo como fuente de energía, se registró el potencial de la pila de manera continua. Conociendo el potencial de la pila y el valor de la resistencia conectada, se puede calcular la potencia eléctrica generada mediante la relación:

$$P (W) = \frac{V(V)^2}{R (\Omega)} \quad (ec. 5.6)$$

En la figura 4.9b se encuentran representados los valores obtenidos de la potencia en función del tiempo. En la gráfica se puede observar como durante los primeros 2-3 segundos la pila experimenta una caída de potencial (y por lo tanto de potencia) debido a caídas por activación. Durante los 30 segundos en los que se realizó la medida, las concentraciones más elevadas apenas experimentan caída de potencial debido a que, al tener suficiente BQ oxidada, son capaces de suplir la corriente que demanda el punto de trabajo impuesto por la resistencia de carga. Sin embargo, a las concentraciones más bajas de Ab-HRP, las pérdidas de concentración generan una caída paulatina de potencial que se refleja en una pérdida de potencia generada. Cabe destacar que, en el caso de concentración 0 de Ab-HRP, también existe generación de potencia. Durante los primeros 5 segundos, la corriente generada corresponde a la reducción de la HQ oxidada de manera espontánea a través del oxígeno presente en la disolución. Posteriormente, vemos que la respuesta se estabiliza

a aproximadamente 1.35 V, punto en el que se produce la reducción del H₂O₂ añadido como substrato enzimático. Esto produce un efecto colateral que resulta beneficioso desde el punto de vista de aplicabilidad del sensor autoalimentado diseñado en esta tesis, ya no solo es capaz de generar energía a diferentes concentraciones de BQ, sino que también es capaz de mantener una generación de potencia estable entorno a los 7 μ W como señal de blanco gracias a la presencia de H₂O₂ remanente en la disolución. En la figura 4.8c se representa la potencia puntual generada después de los 30 segundos de operación en función de la concentración de Ab-HRP. A la curva se le ha representado mediante un ajuste matemático logístico con un valor de ajuste de $R^2 = 0.9971$. El valor del LOD obtenido es de $20 \pm 2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, valor muy similar a los reportados en otros inmunoensayos electroquímicos en dispositivos basados en papel [102]. Cabe destacar que las potencias obtenidas en el prototipo ($\sim 10 \mu\text{W}$) son suficientes para alimentar pequeños módulos electrónicos que permiten el análisis y cuantificación de la señal.

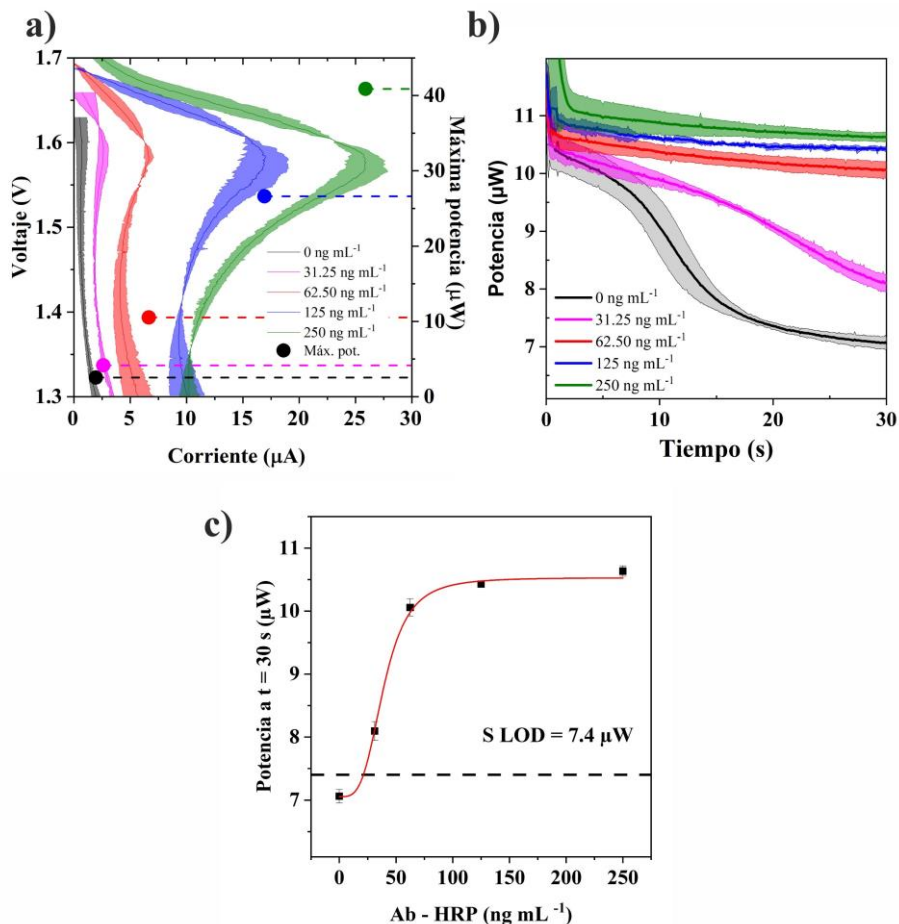


Figura 4.9. a) LSV de la pila final a diferentes concentraciones de Ab-HRP incubadas en eppendorf y transferidas a la NC. b) Potencia generada en la pila por las diferentes concentraciones de Ab-HRP conectadas a una resistencia de 270 k Ω . c) Potencia generada a diferentes por la pila durante 30 segundos en función de la concentración de Ab-HRP.

4.2.5 Detección autoalimentada de CRP en una muestra artificial

Como paso final del desarrollo del inmunosensor, se procedió a caracterizar el sistema con distintas concentraciones de CRP de una forma autoalimentada. Se siguió el protocolo establecido en el apartado anterior y el valor de la pila conectada fue de 270 k Ω . En la figura 4.10 se pueden observar los valores de

potencia obtenidos para concentraciones de CRP dentro del rango de 0-2 mg·L⁻¹. Comprobamos que, en este caso, la respuesta de la pila mantiene una dependencia directamente proporcional a la concentración de CRP. El ajuste matemático realizado con las potencias generadas a tiempo de 30 segundos fue muy satisfactorio ($R^2 = 0.9987$), obteniendo un LOD de 0.27 ± 0.04 mg·mL⁻¹. Cabe destacar que el límite de detección tiene un valor muy similar a aquellos reportados en kits de alta sensibilidad frente al CRP, como por ejemplo el comercializado por Randox (Reino Unido), en el que su valor es de 0.2 mg·mL⁻¹.

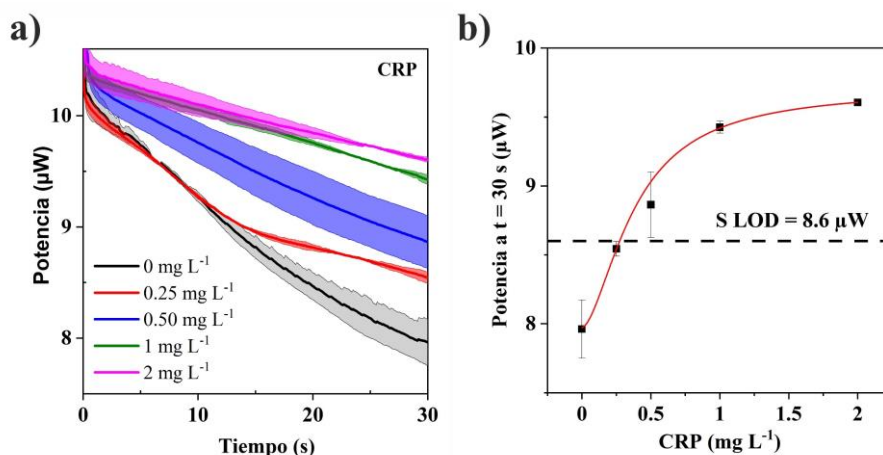


Figura 4.10. A) Potencia generada por la pila conectada a una resistencia de 270 kΩ en un inmunoensayo completo a diferentes concentraciones de CRP. B) Potencia generada después de 30 segundos en función de la concentración de CRP.

Al establecer una comparación con dispositivos comerciales no autoalimentados para la detección del CRP (por ejemplo, el kit comercializado por *Randox*), el dispositivo de esta tesis presenta unos resultados muy competitivos dentro de un rango de analito de interés clínico. Además, los valores de los límites de detección de la pila son comparables con aquellos reportados en la literatura para la detección de distintas proteínas con detección cronoamperométrica en dispositivos basados en papel [103,104] operados con un potencióstato y una fuente de energía externa. Por otra parte, es también interesante comparar los resultados con aquellos trabajos en los que realizaron

detección autoalimentada. Como se puede apreciar en la tabla 4.1, varios trabajos fueron capaces de generar una potencia al detectar un analito en una muestra. Sin embargo, en todos ellos se basaron en una celda de combustible de tipo enzimático, con la consecuencia de que los voltajes estaban limitados al sistema, sin superar en ninguno de los casos 1 V de salida. En este trabajo se realiza un cambio de paradigma a la hora de realizar un inmunoensayo autoalimentado al usar Mg como ánodo y electrodo no limitante. De esta forma, se ha podido llegar a superar 1.55 V de salida. Además, es el único trabajo en el que se añade una resistencia para trabajar en un modo real de autoalimentación.

Tabla 4.1. Comparación de sensores autoalimentados de la bibliografía

Ref.	Analito	Ánodo (sustrato)	Cátodo (sustrato)	Máx. Pot / $\mu\text{W cm}^{-2}$	Voltaje / V	LOD
<i>Esta tesis</i>	CRP	Mg	Enzima-Ab (H₂O₂)	571	> 1.55	270 ng mL⁻¹
[89]	Antibióticos	Enzimático (lactosa)	Enzima-Ab (H ₂ O ₂)	7	0.5	2.4 ng mL ⁻¹
[88]	Nε-CML	Enzimático (glucosa)	Enzima-Ab (O ₂)	450	> 0.65	0.2 nM
[92]	Células tumoraes	Enzimático (glucosa)	Enzimático (O ₂)	-	> 0.6	2-3 células
[91]	CEA	Enzimático (glucosa)	Enzimático (O ₂)	143	> 0.65	7 · 10 ⁻⁵ ng mL ⁻¹
[90]	Melamina	Enzimático (glucosa)	Enzimático (O ₂)	-	> 0.45	2.1 pM
[93]	Trombina	Enzimático (glucosa)	Ferrocianuro	-	> 0.80	0.9 nM

4.3 Conclusiones

Este capítulo presenta un inmunosensor capaz de detectar una biomolécula en un formato completamente autoalimentado y con un voltaje de salida superior a 1.55 V. El dispositivo se ha conectado a una resistencia externa para trabajar en una operatividad real de autoalimentación. Al medir la potencia de salida de la pila después de 30 segundos de medida, se ha determinado que el límite de detección es de 20 ng mL^{-1} , en línea con otros trabajos reportados en ePADS de inmunodetección, en los que se emplea NC para la inmovilización de anticuerpos y se realizan medidas electroquímicas para la detección de analitos. Los resultados obtenidos corroboran que la estrategia propuesta en esta tesis permite convertir un inmunoensayo amperométrico en un sensor autoalimentado sin pérdida de sensibilidad. Cabe destacar que las densidades de potencia generadas por este sensor se sitúan en el rango de 40 a $571 \mu\text{W cm}^{-2}$, valores capaces de alimentar un circuito electrónico de baja potencia que permitiría una digitalización de la señal sin necesidad de fuentes de energía suplementarias.

A partir de esta primera prueba de concepto, se vislumbran diferentes caminos de mejora que puedan permitir una maduración tecnológica y la consiguiente aplicación del dispositivo a entornos reales. En primer lugar, cabría implementar un inmunoensayo de tipo sándwich directo, que a pesar de ser menos sensible permite disminuir los pasos y el tiempo de realización del ensayo. Desde el punto de vista de la arquitectura, sería interesante desarrollar estrategias microfluídicas de tipo 2D para almacenar los anticuerpos marcados y el sustrato HQ en el propio dispositivo antes de añadir la muestra, tal y como sucede en un flujo lateral. Otro aspecto importante que valorar es el uso de enzimas como marcadores de anticuerpo, ya que su dependencia de un sustrato y su variabilidad en función de la temperatura de trabajo complican la operación del dispositivo. En un laboratorio y en medidas ópticas, el trabajar con HRP no

resulta un problema, ya que se efectúan controles de calibración periódicos en ensayos con placa ELISA y la adición de H_2O_2 no añade demasiada complejidad al protocolo de medida. En cambio, en los dispositivos de un solo uso es indispensable simplificar los pasos de operación – y la adición de H_2O_2 implica un paso adicional - así como asegurar la robustez del sistema, ya que no es posible realizar calibraciones in-situ de las enzimas. En este sentido, la sustitución de la enzima HRP por una enzima que use como sustrato O_2 o por una alternativa inorgánica – nanoenzima – permitiría eliminar estos obstáculos y conferir la simplicidad y robustez a esta prueba de concepto.

4.4 Materiales y métodos

Disoluciones y productos químicos. La solución tampón de fosfatos (PBS) se preparó con la mezcla de hidrogenofosfato de potasio (Sigma-Aldrich), dihidrogenofosfato de sodio (Sigma-Aldrich) y un 8% en peso de NaCl en cantidades estequiométricas adecuadas para obtener un pH de 7.5 y 0.1 M de fosfatos. En caso de ser necesario, se ajustó el pH con NaOH o HCl. Las disoluciones de H₂O₂ y HQ (ambas Sigma-Aldrich) de 0.1M se prepararon de nuevo cada día antes de empezar los experimentos. Los reactivos usados en el inmunoensayo fueron CRP (BCN4799P, AntibodyBCN, España), Anti-CRP (goat monoclonal, Ref. BCN4799, AntibodyBCN, España), Anti-CRP (rabbit polyclonal, Ref. C3527, Sigma-Aldrich) y anti-rabbit IgG-HRP (polyclonal, Ref. A0545, Sigma-Aldrich).

Serigrafía. Los SPE se fabricaron de forma manual con la ayuda de una máquina de fabricación casera. Primero se depositaron las pistas conductoras con una pasta de plata (Loctite, ECI1011 E&C) sobre un sustrato de tereftalato de polietileno (PET, Policrom, Italia). Para curar la pasta, se calentó 15 minutos a 150°C. Seguidamente se serigrafió el pseudoelectrodo de referencia con una pasta de Ag/AgCl (Gwent, C2130905D3) y se curó a 80°C durante 15 minutos. Por último, se serigrafiaron el electrodo de trabajo (con un área total de 0.07 cm²) y el contraelectrodo con una pasta de carbono (Gwent, C2030519P4). Para evitar que las pistas entren en contacto con la disolución, estas se taparon con vinilo.

Prototipaje. La inmuno-pila se diseñó con el software CorelDraw Graphics Suite 2019 (Corel Corporation). La fabricación se llevó a cabo mediante técnicas de prototipaje rápido haciendo uso de un láser de CO₂ (Epilog Fusion Edge, Golden) y de un plotter Roland GX-24 CAMM-1 (Roland DG North Europe). El soporte se conformó de polimetilmetacrilato (PMMA, Plexiglas). Los papeles que se usaron fueron Whatman CF7, Nitrocelulosa AE100 y

Standard 14 (todos ellos de GE Healthcare). El Mg que se usó en el ánodo se obtuvo de Galliumsource LLC. Los adhesivos usados fueron el Ref 8939 y el 92712 de Adhesive Research mientras que el vinilo blanco se obtuvo de Metamark.

Electroquímica. Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en un potenciostato Autolab PGSTAT-204 (Metrohm), mientras que los tratamientos de datos, las gráficas y los correspondientes ajustes matemáticos se realizaron con el programa OriginPro 2019b.

Activación del WE. Antes de cada uso, los SPE se activaron electroquímicamente. Para ello se aplica 1.5V respecto al pseudoreferencia de Ag/AgCl durante 5 minutos. Se lava con agua desionizada y se seca con una pistola de aire de N₂.

5 Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

Capítulo 5: Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

5.1 Introducción

Las enzimas, gracias a su alta especificidad y actividad catalítica, son un elemento fundamental en muchas de las técnicas de diagnóstico clínico, como por ejemplo los ensayos de tipo ELISA [105]. Sin embargo, debido a su estructura proteica con enlaces químicos débiles [106], su actividad puede variar e incluso desaparecer frente a cambios en la temperatura, fuerza iónica o pH [107]. De esta forma en su aplicación práctica en el campo de los biosensores – el cual incluye a los inmunoensayos - su actividad debe ser calibrada lote a lote y antes de cada uso [108]. Este último factor hace que su implementación en dispositivos de diagnóstico portátil sea más complejo y por ende, más caro, factor que sumado al coste por gramo de la enzima, genera la necesidad de encontrar distintas alternativas más económicas. Además, muchas de las enzimas requieren de un sustrato – como el H_2O_2 requerido por la enzima HRP en el capítulo anterior – factor que también incrementa la complejidad del dispositivo final.

En la búsqueda de alternativas a las enzimas, en el año 2007 se descubrió que las nanopartículas inorgánicas (NPs) de magnetita (Fe_3O_4) presentaban una actividad catalítica similar a las enzimas de tipo peroxidasa [109]. Desde entonces, ha habido un incremento exponencial en el estudio de nuevas NPs con actividades de tipo enzimático, también conocidas como nanoenzimas [110,111]. Las nanoenzimas presentan unas características que las hacen muy

atractivas: generalmente son muy estables, tienen una alta tolerancia a mantener su actividad catalítica en diferentes medios y el coste de producirlas es bajo. De entre todas las nanoenzimas publicadas hasta la fecha, las NPs de CeO₂ (nanocerias) han generado un gran interés dentro de la comunidad científica debido a que son capaces de mimetizar la actividad catalítica de distintos tipos de enzimas: superoxidasas dismutasas (SOD) [112,113], catalasas [114–116], peroxidasas [117] u oxidasas [118].

El motivo por el cual la nanoceria haya mostrado tener estas habilidades multienzimáticas se debe a su capacidad de ajustar su configuración electrónica en distintos entornos. El Ce es un elemento químico dentro de las tierras raras. Este tipo de elementos tienen los orbitales 4f apantallados por los orbitales 4d y 5p. Este apantallamiento hace que los electrones 4f estén débilmente atraídos por el núcleo permitiendo en el caso del Ce una tautomería entre los estados de oxidación Ce³⁺ y Ce⁴⁺ [119–121]. En el interior de las nanocerias, el estado de oxidación prevalente es el Ce⁴⁺ - en forma de CeO₂ - sin embargo, en su superficie se genera una concentración significativa de vacantes de oxígeno haciendo que parte del Ce⁴⁺ esté presente como Ce³⁺, de manera que en la superficie podemos encontrar tanto CeO₂ como Ce₂O₃. Estas vacantes son las causantes de la actividad catalítica de las nanocerias ya que su relación entre un estado de oxidación y otro es constante. De esta manera, cuando parte del Ce₂O₃ pasa a CeO₂ por acción de algún agente químico externo, este reacciona rápidamente con el oxígeno del entorno para retornar a su estado Ce₂O₃ y volver así a la relación Ce³⁺/Ce⁴⁺ constante en la superficie. La cantidad de vacantes de oxígeno es mayor al disminuir el tamaño de la nanopartícula y puede verse modificada también por el método de síntesis [121,122]. La determinación del ratio entre los dos estados de oxidación se puede obtener mediante diferentes técnicas: UV-Vis [123], resonancia paramagnética electrónica [124] y por espectrometría fotoelectrónica [125] (XPS, por sus siglas en inglés de X-ray photoelectron spectroscopy), siendo esta última la más usada.

El HRP es la enzima más usada en la detección de biomarcadores. Esta enzima necesita como agente oxidante el H_2O_2 . Mientras que en ensayos a nivel de laboratorio como los conocidos ELISA este sustrato se añade como uno de los pasos del protocolo, su implementación en dispositivos portátiles es mucho menos viable, ya que esta molécula se degrada con el tiempo por lo que se debería producir *in-situ* en el dispositivo. De esta forma, hace que sea muy interesante el uso de la nanocería como oxidasa y sustituto del HRP, usando el oxígeno en lugar del peróxido como agente oxidante. En el año 2009 se reportó por primera vez su actividad como oxidasa para una aplicación en biosensado [118]. Concretamente, en este primer estudio realizaron un ensayo de tipo ELISA substituyendo la enzima HRP por nanocería, demostrando así la viabilidad de una futura implementación de la nanocería en el campo de los biosensores.

A partir de este trabajo seminal, podemos encontrar diferentes artículos científicos en los que se estudian y describen distinto aspectos del mecanismo de la nanocería cuando actúa de forma similar a una enzima de tipo oxidasa. Wei *et. al.* proponen que en el mecanismo de oxidación se involucran oxígenos y radicales hidroxilo, sin especificar si es catalítico o no [126]. El grupo de Yang estudió la dependencia del pH en el mecanismo y el rol que tiene el oxígeno en la reacción [127]. En su trabajo, concluyen que el oxígeno presente en el medio afecta a la velocidad de reacción, aunque no participa directamente en ella. Las diferentes conclusiones reportadas evidencia que aún no se ha llegado a un consenso de cual es exactamente el mecanismo de reacción de la nanocería cuando actúa como una enzima de tipo oxidasa.

Por otra parte, el conocimiento y el control de la actividad intrínseca de la nanocería como oxidasa en diferentes condiciones es crucial si se quiere considerar a ésta como una alternativa sólida a la hora de sustituir el HRP en inmunoensayos. Hasta la fecha, se han publicado diversos estudios que describen el comportamiento de la actividad catalítica en soluciones con diferentes fuerzas iónicas y pH, así como la influencia del tamaño de partícula.

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

De entre todas las variables estudiadas, el pH es la que más efecto tiene en la actividad catalítica de la nanocería como oxidasa, restringiendo su actividad únicamente a pHs ligeramente ácidos, entre 4 y 6.

Si evaluamos los estudios publicados hasta hoy, tanto de la actividad catalítica, del mecanismo de reacción de oxidación o de aplicaciones directas de estos mecanismos en biosensado, podemos ver que es muy difícil la comparación de los resultados entre ellos. El problema radica en que no hay un protocolo de caracterización establecido. Por ejemplo, no se tienen en consideración las concentraciones y tamaños de NPs, la fuerza iónica del medio, la relación Ce^{3+}/Ce^{4+} superficial o relación concentración de NP y sustrato. Por último, cabe destacar que, hasta la fecha, todos los estudios de oxidación se han llevado a cabo con moléculas orgánicas con un alto coeficiente de extinción molar, como el TMB o el ABTS, ya que los estudios estaban enfocados a aplicaciones de biosensores ópticos. Este factor restringía los estudios a situaciones en que la concentración de nanopartículas era muy superior a la de las especies a oxidar.

Con la idea de evaluar a la nanocería como sustituto sólido de las enzimas que actúan como marca de anticuerpos en biosensores electroquímicos basados en papel, en este capítulo se estudia como la nanocería se comporta frente al par redox ferro/ferricianuro ($[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$). Este compuesto resulta de particular interés por las razones ya expuestas en el capítulo 3, siendo dos muy relevantes, su extendido uso y su buena capacidad redox en sistemas electroquímicos, además de otros factores que se describirán a lo largo de este capítulo.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Caracterización estructural

Para este estudio, se sintetizaron nanocerías de un diámetro de aproximadamente 3 nm y a una concentración de $1.72 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($1.6\cdot 10^{16}$ NPs $\cdot\text{mL}^{-1}$) mediante una síntesis hidrotérmal con citrato de sodio como agente complejante y estabilizador (ver materiales y métodos para más información). Una vez sintetizada la nanocería, se procedió a su caracterización morfológica.

La caracterización morfológica por HAADF-STEM (Microscopía electrónica de transmisión de barrido con detector de electrones a alto ángulo en campo oscuro) revela la formación de nanopartículas cuasi esféricas y uniformes en tamaño con un diámetro de $2.9 \pm 0.8 \text{ nm}$ (figura 1a). El espectro UV-Vis nos indica una banda de absorción a 282 nm (figura 1b) típica de las nanocerías.

Seguidamente, se realizaron medidas por dispersión dinámica de luz, o DLS, por sus siglas en inglés de *Dinamic Light Scattering*. Estas medidas confirman que las NPs sintetizadas forman una solución coloidal estable sin presencia de agregados. Esto se puede observar al obtener un único pico estrecho a $4.5\pm 0.2 \text{ nm}$ (figura 1c). El potencial zeta obtenido fue de -47.6 mV (a un pH = 9.36 y a una conductividad de $0.24 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), indicándonos que la nanocería está negativamente cargada debido a las moléculas de citrato adsorbidas en su superficie (figura 1d). La caracterización por difracción de rayos X (XRD) (figura 1e) confirma que la nanocería sintetizada forma una única fase cristalina de tipo fluorita (JCPDS N° 34-0394).

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

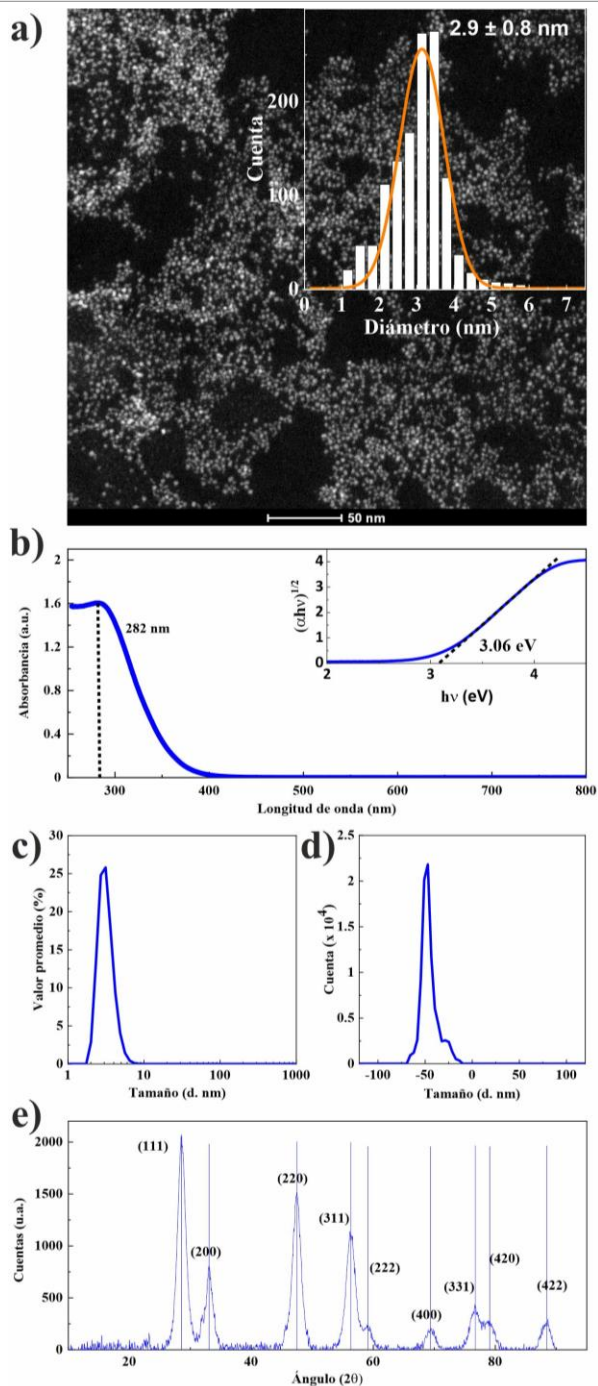


Figura 5.1. Caracterización de la nanocería sintetizada. a) Imágenes de HAADF-STEM. Distribución del tamaño de las partículas (incrustación). b) Espectro UV-Visible. Energía de bandgap óptico determinado por la ecuación de Tauc

(incrustación). c) Perfil hidrodinámico medido por dispersión dinámica de luz. d)
Análisis del potencial Z. e) Patrón de difracción de rayos X

Por último, se caracterizó la nanocería por espectroscopia de rayos X en la banda 3d del Ce. En el espectro se analizaron seis picos de Ce^{4+} (V, V'', V''', U, U'' y U''') (Figura 2 en verde) correspondientes a los dobletes de los tres pares spin-orbitales y cuatro picos (V0, V', U0 y U') (Figura 2 en azul), correspondientes a los dos dobletes, donde U y V se refieren a los componentes 3d 3/2 y 3d 5/2 respectivamente. Las posiciones de los picos se basaron en los reportados en otro estudio [128]. A partir de estos datos, se obtuvo que la concentración de Ce^{4+} es del 64%.

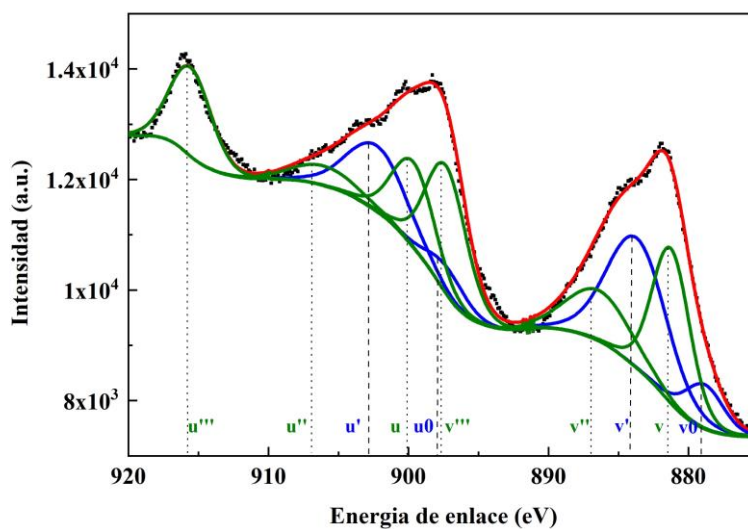


Figura 5.2. Espectro de XPS de la nanocería en la banda 3d

5.2.2 Actividad catalítica de la nanocería en medio ácido

La estabilidad coloidal de las nanocerías es crítica debido a que, si se agregasen, la superficie en contacto con la solución caería drásticamente, y por lo tanto su actividad catalítica. Las NPs tienden a agregarse en disoluciones con una alta concentración iónica. Sin embargo, como hemos analizado en el apartado 2.1.1, las medidas electroquímicas requieren unas condiciones de elevada fuerza iónica para evitar caídas óhmicas entre los electrodos. Según la ecuación de Nernst-Planck (ec. 2.4), una concentración de 100 mM de electrolito soporte podría satisfacer dicha condición si se emplea 1 mM de mediador. Así, en los experimentos llevados a cabo en este estudio, se eligió una solución con iones citrato como electrolito soporte, ya que ayuda a la estabilidad de la nanocería. Además, este ion contribuye a mantener un pH ligeramente ácido, que como se ha indicado en la introducción de este capítulo, es una condición indispensable para que la nanocería actúe como una oxidasa.

La estabilidad coloidal de la nanocería en una solución tampón de citrato a una concentración de 100 mM llevada a pH 4.2 y con una concentración final de NPs de $1.62 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($9.4 \cdot 10^{-1} \text{ mM}$ de cerio atómico total) fue comprobada mediante la observación del espectro UV-VIS de la nanocería durante 60 min. En la figura 5.3 podemos observar como la banda del UV-VIS se mantiene constante durante este periodo, lo que demuestra que bajo estas condiciones y a pesar de la elevada fuerza iónica de la solución, la nanocería se mantiene estable.

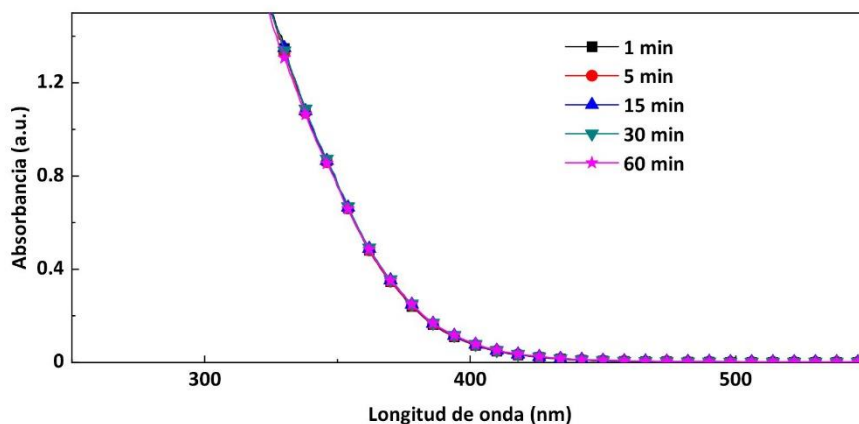


Figura 5.3. Espectro UV-VIS de la nanoceria dispersado en una solución tampón 100 mM de citrato (pH 4.4) durante 60 minutos

Los compuestos químicos que se emplean típicamente como mediadores enzimáticos en ensayos bioanalíticos de tipo óptico son aquellos en los que su ϵ es muy elevado, como el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y la dopamina (DOPA) [118] (tabla 5.1). De esta forma, se obtiene una alta sensibilidad a concentraciones muy bajas. Como contrapartida, esto comporta una saturación muy rápida de la señal óptica, restringiendo así los estudios de catálisis a un rango bajo de concentraciones de estos compuestos. En esta tesis, se eligió estudiar la capacidad de la nanoceria para oxidar ferrocianuro, ya que es un compuesto ampliamente usado como mediador redox en el campo de los biosensores electroquímicos. En su estado de oxidación reducido es incoloro, mientras que al oxidarse es de color amarillo, permitiendo así también su estudio por UV-Vis. A diferencia de los mediadores mencionados anteriormente, el ferrocianuro nos permitió estudiar la oxidación de manera óptica a un rango más amplio de concentraciones debido a que su bajo ϵ [129] hace que la saturación de la señal se produzca a concentraciones más elevadas de compuesto (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Longitudes de onda y absorptividades molares de distintos compuestos orgánicos e inorgánicos

	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
<i>ABTS</i>	415 [130]	36000 [130]
<i>TMB</i>	653 [131]	39000 [131]
<i>DOPA</i>	475 [132]	3700 [132]
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	420 [133]	1040 [133]

Para ello, se monitorizó por UV-VIS el proceso de oxidación del ferrocianuro en presencia de la nanocería. En una primera medida, se expuso 1 mM de ferrocianuro a $8.10 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de nanocería durante 180 minutos. Durante este periodo, la solución fue pasando de incolora a un color amarillo, evidenciando así que se estaba produciendo la oxidación del ferrocianuro (foto insertada en la figura 5.4a). En el espectro UV-Vis podemos observar que el pico característico del ferricianuro va aumentando en función del tiempo hasta que empieza a saturarse al finalizar el periodo de estudio. La ϵ del ferricianuro es de $1040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ver tabla 6.1), la cubeta que se ha usado tiene un camino óptico de 1 cm y la concentración de ferrocianuro es de 1 mM. Con estos valores y mediante la ecuación de Lambert-Beer (ec. 2.15), podemos calcular que el valor de absorbancia máximo esperado es de 1.04. Sin embargo, en las condiciones de trabajo hemos obtenido una saturación de la reacción a un valor por debajo de 0.5, lo cual nos hace concluir que la reacción se ha detenido antes de alcanzar la oxidación completa del mediador. Este fenómeno – no reportado en la literatura- puede deberse a dos motivos distintos: o bien la nanopartícula experimenta una pérdida de actividad catalítica hasta detenerse por completo o bien la nanocería se comporta como un agente oxidante y no como un catalizador.

Para dilucidar qué es lo que realmente ocurre, se procedió a evaluar la actividad de la nanocería a diferentes concentraciones, desde $8.10 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta

$1.62 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, manteniendo fija la concentración de ferricianuro a 1 mM. En la figura 5.4b podemos observar los espectros de absorción correspondientes a cada una de las concentraciones de nanoceria después de 3 horas de reacción. La intensidad de los picos del ferricianuro muestra una clara proporcionalidad con relación a la concentración de nanoceria inicial, sugiriendo así que posiblemente la NP esté actuando como un agente oxidante y no como un catalizador.

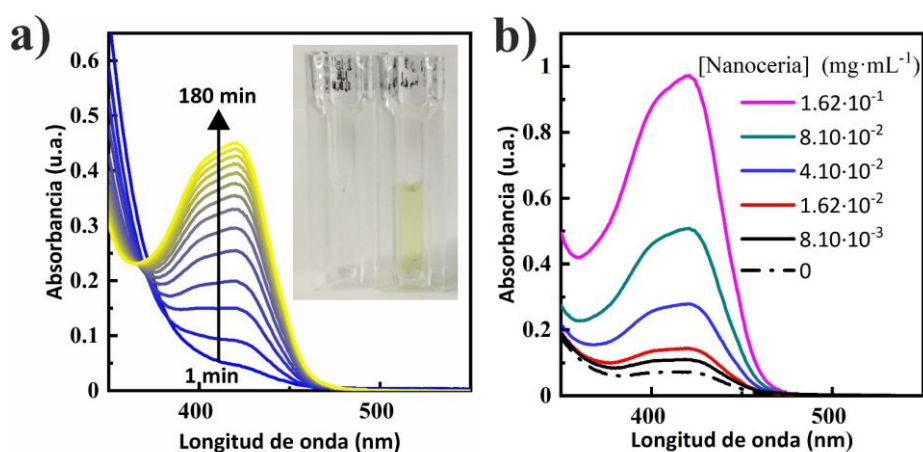


Figura 5.4. a) Espectro UV-Vis en función del tiempo de una solución de 1 mM de ferrocianuro expuesta a $8.1 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de nanoceria; b) Espectros UV-VIS finales de soluciones de 1 mM de ferrocianuro expuestas a diferentes concentraciones de nanoceria.

Para poner en evidencia este comportamiento, se llevó a cabo un experimento de oxidación del ferrocianuro con una enzima. En particular, se eligió la enzima lacasa, que al ser de tipo oxidasa, usa el oxígeno como agente oxidante. Esta enzima actúa de manera similar a como otros autores han descrito la actividad catalítica de la nanoceria frente a otros mediadores en las condiciones de trabajo de este estudio. Así, en el siguiente experimento se monitorizó el proceso de oxidación del ferrocianuro (1 mM) en función del tiempo en presencia de lacasa a una concentración de $1.62 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. En la figura 5.5a se muestran los resultados obtenidos conjuntamente con los perfiles de oxidación registrados a diferentes concentraciones de nanoceria. Vemos como a diferencia de la

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

nanoceria, que muestra una tendencia de saturación, la enzima muestra un comportamiento lineal en función del tiempo, en concordancia con su actividad catalítica intrínseca. Esta diferencia en la evolución de la oxidación del ferrocianuro, pone de manifiesto la semejanza del comportamiento de la nanoceria con el de un agente oxidante – que se consume a medida que avanza la reacción - y no al de un agente catalítico. Otra observación que refuerza esta hipótesis es que si se observa con más detenimiento el espectro UV-Vis del conjunto nanoceria-ferricianuro (figura 5.5b), se puede apreciar como el hombro característico por debajo de los 350-300 nm de la nanoceria se va atenuando a medida que la reacción avanza. Este cambio se puede atribuir a los cambios de oxidación del cerio de Ce^{4+} a Ce^{3+} a medida que el ferrocianuro se oxida a ferricianuro.

Para observar si este efecto es consistente independientemente del método de síntesis, se repitió el mismo experimento con nanoceria comercial. En la figura 5.5c se muestran los espectros de absorbancia correspondientes al inicio del experimento y en condiciones de saturación de las nanocerias comerciales y sintetizadas en el IMB-CNM en las mismas condiciones experimentales y a la misma concentración. Como cabe esperar, la respuesta inicial es prácticamente idéntica, ya que las nanocerias no han tenido prácticamente tiempo de reaccionar con el ferrocianuro. Sin embargo, al final de la reacción tanto la disminución de la respuesta a longitudes de onda bajas como la amplitud del pico del ferricianuro fue más acusada en el caso de las nanopartículas sintetizadas en el laboratorio que en el de las comerciales. Teniendo en cuenta que ambas nanopartículas muestran un comportamiento de saturación de la señal y que por tanto es consistente con un comportamiento de agente oxidante, los resultados nos sugieren que las nanocerias comerciales tienen una menor capacidad oxidativa, lo que traduciría en una menor cantidad de Ce^{4+} en su superficie.

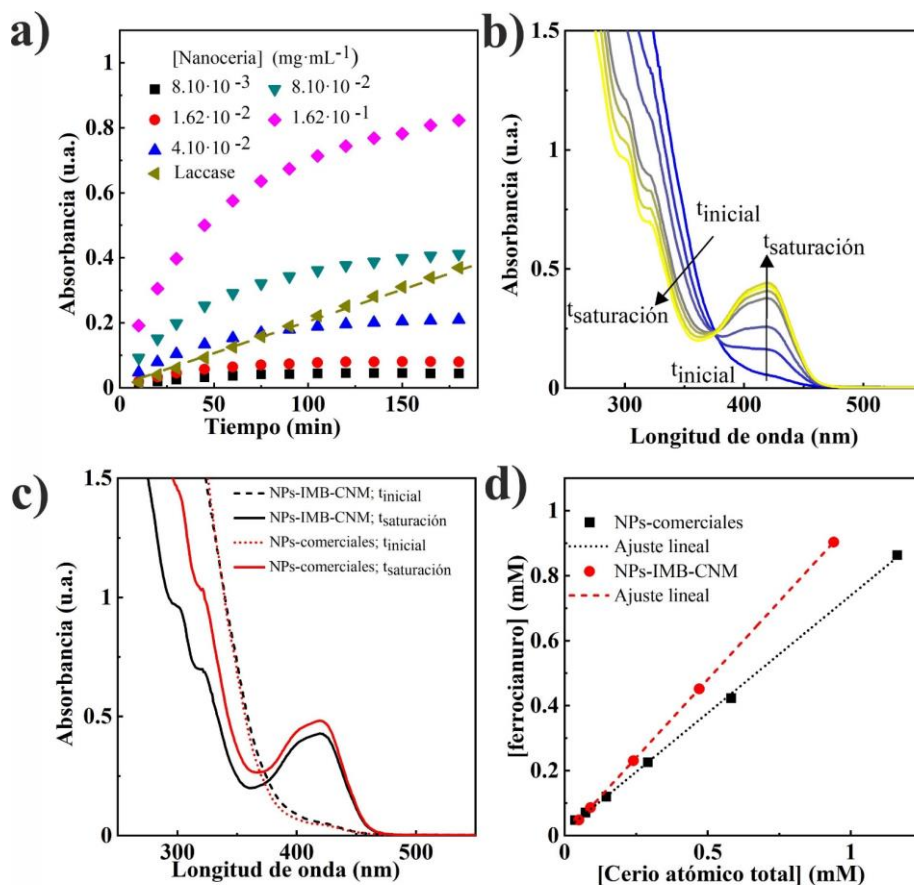
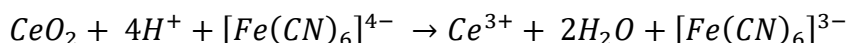


Figura 5.5. (a) Valores de absorbancia a 420nm después de 180 minutos de reacción entre 1mM de ferrocianuro y diferentes concentraciones de nanoceria, entre $8.10 \cdot 10^{-3}$ mg mL⁻¹ to $1.62 \cdot 10^{-1}$ mg mL⁻¹ y frente a la lacasa a una concentración de $1.62 \cdot 10^{-4}$ mg mL⁻¹. (b) espectros de absorbancia de 1mM de ferrocianuro espuesto a $8.10 \cdot 10^{-2}$ mg mL⁻¹ durante 60 minutos. (c) comparación de los espectros UV-Vis iniciales y después de 60 minutos de nanocerias comerciales y sintetizadas en el IMB-CNM frente a 1 mM de ferrocianuro. (d) relación atómica entre el ferricianuro obtenido de la reacción y el cerio atómico añadido a la solución.

Para comparar la capacidad oxidativa de las dos muestras de nanocerias, se ha representado la cantidad total de ferricianuro obtenida una vez detenida la reacción de oxidación en función de la cantidad total de cerio atómico presente en la disolución. Como se puede observar en la figura 5.5d, en ambos casos se obtiene una dependencia lineal ($R^2 > 0.999$) entre la cantidad molar de cerio atómico total presente en la disolución y la cantidad de ferrocianuro oxidado.

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

Con todos los resultados obtenidos hasta ahora, podemos afirmar que la nanocería en estas condiciones de trabajo (pH ligeramente ácido), actúa como agente oxidante y no como agente catalítico, tal y como otros autores habían reportado [118,126,127]. Las pendientes obtenidas en el ajuste lineal son de 0.72 ± 0.01 para la nanocería comercial y 0.94 ± 0.02 para la nanocería sintetizada en nuestro laboratorio. Considerando que la reacción redox que tiene lugar entre la nanocería y el ferricianuro es la siguiente:



Podría esperarse que la pendiente del ajuste lineal entre la cantidad de cerio total y de ferrocianuro oxidado tuviera un valor próximo a 1 en ambos casos. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, la relación $Ce^{3+/4+}$ en una partícula de cerio puede variar. Las diferencias entre las dos muestras se deben a que tanto los métodos de síntesis como los tamaños de las nanocerías son distintos y estas diferencias influyen en la relación $Ce^{3+/4+}$ presente en la superficie. En la caracterización de las nanocerías por XPS (apartado anterior) se observó que la cantidad Ce^{4+} presente en las muestras respecto al Ce^{3+} después de llevar a cabo la síntesis en el laboratorio fue del 64%. La diferencia entre este valor y el valor de CeO_2 estimado a partir de la cantidad de ferrocianuro oxidado pueden ser debidas a las variaciones introducidas por los distintos medios en los que se realizan las medidas: en condiciones de vacío en el XPS y en un medio acuoso ligeramente ácido en el caso de las medidas espectrofotométricas. En este sentido, consideramos que la medición de la capacidad oxidativa de las nanopartículas en presencia de un mediador redox y un medio acuoso dónde este último se encuentre en exceso puede resultar un método fiable y sencillo para estimar la relación $Ce^{3+/4+}$.

En la bibliografía se ha reportado que las nanocerías pierden su actividad a medida que se aumenta el pH sin que se establezca una causa clara. Bajo la óptica aportada por la presente tesis en la que la nanocería actúa como agente oxidante, una forma de explicar el efecto del pH en la reacción de oxidación es

mediante los diagramas de Pourbaix. Un diagrama de Pourbaix representa la estabilidad de las diferentes fases que pueda formar un elemento químico en función del pH del entorno electroquímico en el que se encuentra. En la figura 5.6 se representa un diagrama de Pourbaix del Ce reportado en la bibliografía. Existen varios diagramas publicados y entre ellas se pueden observar ligeras diferencias, ya que al estar calculados por la ecuación de Nernst (ec. 2.2), pueden sufrir variaciones en función de la concentración de iones disueltos en la disolución que se tenga en cuenta. Independientemente del diagrama elegido, se observa que a pHs básicos, el CeO_2 es estable en una fase acuosa. Por el contrario, a pHs ácidos el CeO_2 deja de ser estable y el Ce^{3+} pasa a ser la forma más estable.

A pHs ligeramente básicos ya se ha demostrado que las nanocerias actúan como SOD, es decir, cuando el CeO_2 de la nanoceria pasa a Ce_2O_3 , rápidamente tiende a volver a CeO_2 , que es termodinámicamente más estable, actuando así, como un agente catalítico. Sin embargo, a pHs ligeramente ácidos en los que la nanoceria se enfrenta a un mediador redox como el ferrocianuro, el ABTS o el TMB, ésta no actúa como oxidasa. Esto es debido a que cuando el CeO_2 pasa a Ce_2O_3 no tiene una tendencia a volver a un estado de Ce^{4+} , sino a disolverse a Ce^{3+} , su forma más estable termodinámicamente a pHs ácidos.

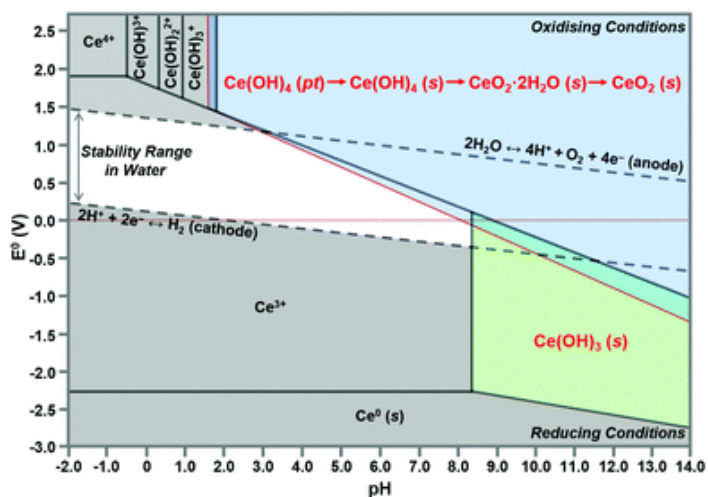


Figura 5.6. Diagrama de Pourbaix del Ce [140].

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

A pesar de las evidencias presentadas en este trabajo de que la nanocería actúa como un agente oxidante a pHs ligeramente ácidos, en el pasado diversos autores han reportado erróneamente la actividad de la nanocería como un agente catalítico. Una de las razones de esta confusión se debe a que en las condiciones experimentales reportadas, el contenido total de cerio atómico siempre se encontraba en exceso respecto a un determinado mediador, como por ejemplo el ABTS o el TMB. Como ya se ha mencionado, estos compuestos tienen unos coeficientes de extinción molar muy elevados, por lo que sus concentraciones debían mantenerse muy bajas para no saturar la señal del espectrofotómetro. Para representar esta situación y reproducir el comportamiento descrito en la literatura, se fijó una concentración de nanocería de $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que corresponde a 2.3 mM de cerio atómico total, frente a diferentes concentraciones de ferrocianuro en exceso y en defecto respecto a la nanocería (desde 0 hasta 2.5 mM). Como comparación también se ha estudiado el mismo caso con una concentración elevada ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de lacasa. Los valores de absorbancia a 420 nm obtenidos después de 60 minutos de reacción se han representado en la figura 5.7. Se observa que, hasta una concentración de 1.5 mM de ferrocianuro, en todos los casos se sigue una tendencia lineal, indicando que todo el contenido de ferrocianuro presente en la solución añadido es oxidado. Como es evidente, el comportamiento de la enzima sigue la misma tendencia, es decir, la catálisis tiene lugar hasta producir la oxidación total del mediador redox. En este sentido, tanto nanocería como enzima muestran el mismo comportamiento, lo que históricamente ha llevado a atribuir a la nanocería un comportamiento catalítico. Ahora bien, cuando la concentración inicial de ferrocianuro excede los 1.5 mM , vemos como la señal correspondiente a las nanocerías abandona la linealidad para posteriormente saturarse, mientras que la lacasa sigue progresando de manera lineal. Esto indica que, a diferencia de la enzima, la nanocería es incapaz de seguir oxidando mediador, lo cual evidencia su comportamiento como agente oxidante. Además, teniendo en cuenta los valores obtenidos en los experimentos anteriores, en el que se ha obtenido la cantidad de Ce^{4+} presente para cada caso,

podemos deducir que la capacidad para oxidar ferrocianuro de las nanocerías comerciales y las nanocerías sintetizadas en nuestros laboratorios se estima en 1.65 mM y 2.15 mM respectivamente, valores alrededor de los cuales la absorbancia muestra saturación en cada uno de los casos (indicados con una línea discontinua en la figura 5.7).

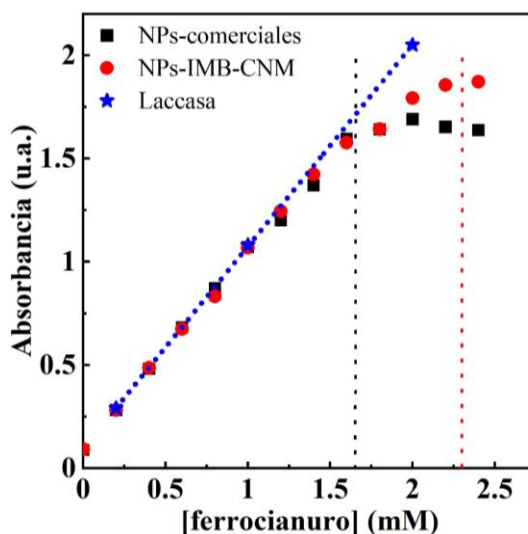


Figura 5.7. Valores de absorbancia a 420nm después de 60 minutos de reacción a una concentración fija de nanocería de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a diferentes concentraciones de ferrocianuro.

Para corroborar la disolución de las nanopartículas una vez agotada su capacidad de oxidación (observada cuando el ferrocianuro está en exceso) se realizaron medidas en TEM. Una vez finalizadas las medidas redox, no se observaron nanopartículas en las rejillas de soporte, evidenciando así la desaparición de estas. El siguiente paso en este trabajo fue estudiar el proceso de desintegración de la nanocería. Para observar este proceso, se llevaron a cabo medidas de DLS e ICPMS a diferentes ratios de concentraciones de ferrocianuro y nanocería después tres horas de incubación. Para ello se mantuvo constante la concentración de Ce atómico molar (2.35 mM) y se seleccionaron cuatro concentraciones distintas de ferrocianuro: 0.77, 1.16, 1.54 y 2.35 mM.

Estudio de la capacidad oxidativa de las nanopartículas de óxido de cerio como alternativa inorgánica a las enzimas

En la figura 5.8a se puede apreciar que el tamaño de las nanocerias disminuye progresivamente a medida que la ratio Ce atómico/ferrocianuro se acerca a 1, mientras que en la figura 5.8b se observa que el número de partículas en disolución se mantiene constante. Las medidas de ICP-MS (Figura 5.8c) nos indican que al aumentar el ferrocianuro, hay más Ce^{3+} disuelto en la disolución. Las diferencias que se observan en los valores esperados y medidos son debidas a que algunos iones quedan retenidos en los filtros durante la purificación. Estos resultados corroboran la disolución progresiva de la nanoceria mientras disminuye su tamaño.

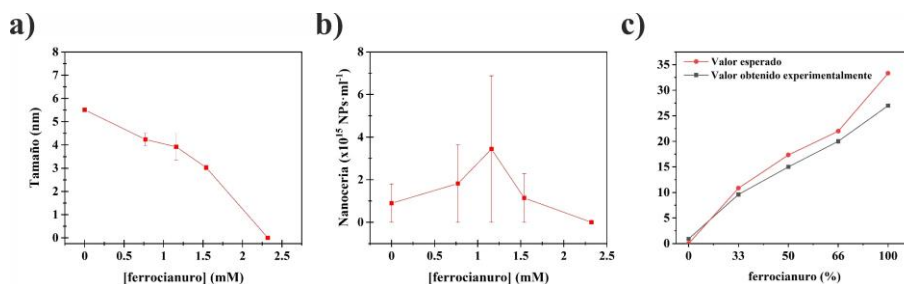


Figura 5.8. a) Valores de tamaño de partícula medidas por DLS; b) concentración de NPs medidas por DLS; c) cantidad de cerio atómico medido por ICPMS.

Como se ha apuntado ya al principio de este capítulo, las nanoenzimas pueden considerarse como sólidas candidatas a substituir las enzimas en métodos de diagnóstico de laboratorio e incluso ser incorporadas en dispositivos de diagnóstico portátiles basados en papel. Una de las principales razones es que las nanopartículas no requieren de una calibración de su actividad a lo largo de su cadena de uso. Para corroborar este aspecto, se comparó la actividad oxidativa frente al ferrocianuro de dos lotes distintos de lacasa y de las dos nanocerias estudiadas en este capítulo. Los resultados se han representado en la figura 5.9a. Se puede observar como pese a ser el mismo organismo, los dos lotes de lacasa presentan una actividad por gramo muy diferente, mientras que las nanopartículas muestran actividades por gramo de cerio idénticas. Otro aspecto importante de las nanoenzimas respecto a las enzimas naturales son su robustez, lo que se traduce en que no precisan de condiciones de

almacenamiento específicas. En la figura 5.9b se observa la actividad de la nanoceria medida el día de su síntesis, después de 15 días y al cabo de un mes. Durante este periodo, las nanocerías fueron almacenadas en la solución de síntesis dentro de un bote de cristal y con exposición no controlada a la temperatura y la luz ambiental del laboratorio. Como se puede ver, la capacidad oxidativa de la nanoceria permanece inalterada.

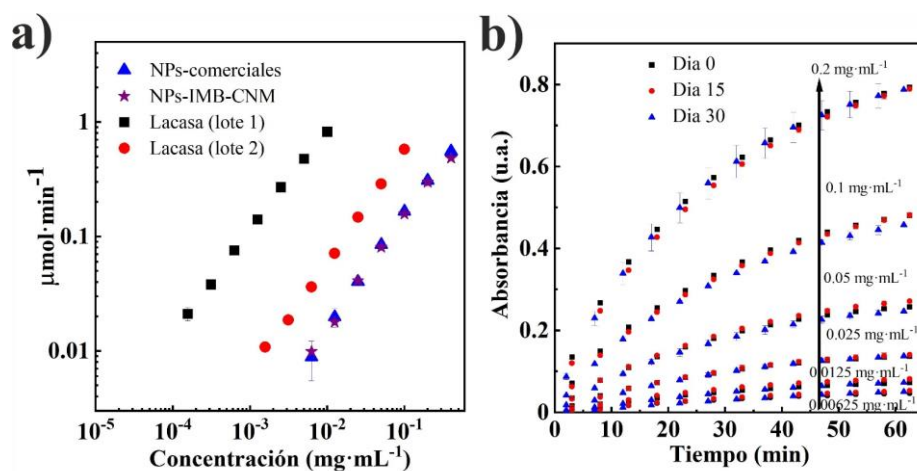


Figura 5.9. a) Velocidad de reacción de dos lotes diferentes de Lacasa y dos nanocerías de diferentes síntesis en presencia de 1 mM de ferrocianuro; b) medidas de absorbancia da 420 nm a diferentes días de un sistema nanoceria-ferrocianuro (1mM).

5.3 Conclusiones

El hecho de que la actividad química de la nanocería frente a un compuesto redox en medios ligeramente ácidos se haya reportado en condiciones muy distintas de fuerza iónica, tamaño y concentración de NP, dificulta la comparación directa entre los datos. Hasta la fecha, esto dificultaba el concluir si en estas condiciones la nanocería actúa como agente oxidante o como agente catalítico. En esta tesis, al estudiar la actividad frente a diferentes relaciones NP/sustrato y al comparar la actividad de la nanocería y la lacasa, se evidencia claramente que a pHs ligeramente ácidos, la nanocería es un reactivo químico oxidante. En consecuencia, en presencia de un compuesto redox el Ce^{4+} (en forma de CeO_2) insoluble de la nanocería se transforma en Ce^{3+} (en forma de Ce_2O_3) y posteriormente se disuelve en el medio de forma irreversible. Cuando la concentración total de cerio atómico dentro de las NPs está en exceso con respecto al sustrato, las enzimas y las NPs parecen comportarse de manera similar, hecho que ha llevado a otros autores a atribuir erróneamente una actividad catalítica a la nanocería. Otro resultado destacable en el presente estudio es mediante un simple análisis volumétrico (titulación) se puede estimar la relación Ce^{4+}/Ce^{3+} de una muestra de nanocería. Este procedimiento podría convertirse en una herramienta de evaluación de composición de dicha relación en ambientes líquidos rápida y sencilla, ya que hasta la fecha se realiza mediante XPS o resonancia magnética electrónica, mucho más complejas y costosas.

En el contexto de esta tesis doctoral, se ha demostrado que las nanocerías pueden superar muchas de las limitaciones que presentan las enzimas naturales en su implementación en dispositivos portátiles analíticos. Además de su reproducibilidad, se ha comprobado que las nanocerías son compuestos muy robustos, manteniendo la misma actividad oxidativa durante más de un mes en condiciones de almacenamiento escasamente controladas. Por último, el

descubrimiento de su comportamiento como agente oxidante tiene dos ventajas añadidas des del punto de vista de su implementación como marca de un elemento de bioreconocimiento (por ejemplo, un anticuerpo). En primer lugar, no precisa del aporte de un sustrato y, en segundo lugar, el cese de la reacción oxidativa una vez consumido el cerio disponible, permite prescindir de la necesidad de controlar el tiempo de reacción como ocurre con una enzima. Ambos aspectos permitirán desarrollar dispositivos portátiles más sencillos y robustos.

5.4 Materiales y métodos

Síntesis de la nanocería. La nanocería se ha sintetizado por un método hidrotermal basado en la precipitación del CeNO_3 en presencia de ácido cítrico. Se añadió una solución de TMAOH (50 mL, 50 mM) a 50 mL de CeNO_3 (20 mM) y citrato de sodio (40 mM). Se dejó la mezcla agitándose durante toda una noche. Seguidamente, la mezcla fue llevada con reflujo a 100°C durante 4 horas y dejado enfriar hasta temperatura ambiente.

Preparación de la solución de citrato. La solución de citrato se preparó con el objetivo de obtener una solución tampón de pH 4.4. Para ello, se mezcló una solución 0.2M de ácido cítrico (Panreac), una solución 0.2 M de citrato de sodio 0.2M (Probus) y agua desionizada en unas proporciones volumétricas de 28:23:49 respectivamente.

Microscopia de transmisión electrónica (STEM). Las nanopartículas de cerio se visualizaron por STEM (Tecnai F20 S/TEM). Para ello se depositaron $10\ \mu\text{L}$ de la solución con nanocería en una gradilla de cobre. Para la distribución de partículas se tuvieron en cuenta el conteo de al menos 200 partículas.

Espectros UV-Vis. Para los estudios cinéticos mediante absorbancia se hizo uso de una placa de 96 pocillos (Sigma-Aldrich). Los pocillos se rellenaron con la cantidad necesaria de nanopartículas comerciales, nanopartículas caseras y de los dos lotes de Lacasa, que fueron denominadas L1 (Lacasa obtenida de *Trametes versicolor* obtenida en Sigma-Aldrich EC 1.10.3.2, con referencia 51639) y L2 (Lacasa obtenida de *Trametes versicolor* obtenida en Sigma-Aldrich EC 1.10.3.2, con referencia 38429). Todas las soluciones tuvieron como medio la solución tampón de citrato descrita anteriormente. Como mediador, se usó ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Sigma-Aldrich) con una concentración final de 1 mM.

Las medidas cinéticas se realizaron con un lector de placas (Varioskan Flash from Thermo Scientific) a una longitud de onda de 420 nm cada 30 segundos durante una hora. Las medidas a longitudes de onda desde 250 hasta 900 nm se realizaron en una cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro comercial (DU730, Beckman Coulter).

DLS. Para la medida de las nanopartículas de CeO₂, se ha usado el instrumento Malvern ZetaSizer Ultra (Malvern Instruments, Reino Unido) a una longitud de onda de 532 nm y a un ángulo fijo de 173°.

Reproducibilidad. Para los estudios de reproducibilidad, se realizaron medidas en las mismas condiciones que en los estudios de cinética en el día en el que se sintetizaron las nanopartículas, 15 días después y 30 días después. La solución de la nanocería fue almacenada a temperatura ambiente en un bote de cristal. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism V.8, considerando $p < 0.05$ como valor significativo.

Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICPMS) y Difracción de rayos X (XRD). Los niveles de cerio atómico elemental se analizaron con (7900 ICPMS, Aligent) en el “Servei d’Anàlisi Química” de la Universitat Autònoma de Barcelona. Previamente, las muestras se centrifugaron con unos filtros de 3 kDa (Amicon-Ultra-15, Merck, Alemania) para separar el cerio iónico disuelto de la NP. Seguidamente se hizo una digestión de la muestra en HNO₃ y a 200°C. El patrón de XRD se obtuvo en el difractómetro Rigaku D/Max 2550 con una radiación de Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

6 Conclusiones y perspectivas futuras

Conclusiones y perspectivas futuras

A pesar de los numerosos desarrollos en el campo de la microfluídica, los sistemas Lab-on-a-chip y la biotecnología llevados a cabo en lo que llevamos de siglo, la irrupción de la pandemia de SARS-CoV-2 puso en evidencia la existencia de una gran brecha entre investigación y disponibilidad de una tecnología que pudiera hacer frente a la necesidad de efectuar un diagnóstico rápido a un coste asequible para los sistemas de salud a nivel global. Así, la solución de diagnóstico para la detección rápida del virus consistió en el desarrollo de tests de flujo lateral, una tecnología con más de 6 décadas de antigüedad y que ha constituido la base del diagnóstico rápido a nivel global en campos muy diversos (enfermedades infecciosas, salud femenina, detección de drogas y antibióticos, marcadores cancerígenos y cardíacos...). La clave de su éxito radica en su capacidad de proporcionar un resultado inmediato a un bajo coste, ya que los materiales que constituyen la estructura del test – papel y plástico – son abundantes y baratos y las moléculas de reconocimiento (i.e. anticuerpos y nanopartículas de oro) se usan en muy pequeñas cantidades que no incrementan significativamente el precio final. Además, estos dispositivos tienen la ventaja de ser de fácil manejo, en gran medida debido al uso de la capilaridad de las diferentes membranas de papel para dirigir el flujo.

Pese a todas las ventajas descritas, los tests de flujo lateral también presentan limitaciones que espolean la búsqueda de alternativas. Una de las limitaciones más relevante es la de la sensibilidad. La lectural visual de los tests, que resulta muy conveniente debido a su simplicidad, restringe en gran manera la sensibilidad de la respuesta a la vez que la hace dependiente de la agudeza visual del usuario. Como ya se ha descrito en el apartado introductorio de esta tesis, la industria del diagnóstico ha desarrollado lectores de sobremesa de las

tiras de test basados en lecturas ópticas (colorimetría, fluorescencia...) que aumentan la sensibilidad respecto a la lectura visual, eliminan la subjetividad y a su vez, permiten una digitalización de la señal que permite una mayor trazabilidad de los resultados. No obstante, debido a su complejidad y coste, estas soluciones quedan restringidas a los laboratorios especializados, mientras que los tests de un solo uso de lectura digital en el lugar de asistencia son escasos y limitados a sectores nicho, como los tests de embarazo y ovulación.

La presente tesis doctoral apuesta por la detección electroquímica como principio de lectura que permita digitalizar la señal de un inmunosensor implementado en un sustrato de papel cumpliendo los criterios de bajo coste y sensibilidad requeridos por la OMS para convertirse en una solución global. Además, la generación de una señal electroquímica tiene la ventaja de poder constituir la base de un sensor autoalimentado, lo cual refuerza la simplicidad de la solución y consecuentemente impacta no solo en el coste sino que también contribuye de manera significativa a la sostenibilidad.

Partiendo del conocimiento sobre diferentes ePADs reportados hasta la fecha y de acuerdo con los objetivos establecidos, los resultados obtenidos permiten avanzar en la superación de las limitaciones tecnológicas que presentan los ePADs:

- **La elección del material usado en un ePAD influye de manera muy significativa en la señal electroquímica.** Una primera búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre ePADs evidenció que no existía ningún estudio sistemático sobre el impacto que la elección del tipo de sustrato de papel podría tener sobre la respuesta electroquímica del sensor. La elección de materiales de los trabajos reportados parecía obedecer a criterios fluídicos y de manufacturabilidad - posiblemente heredados de los estudios pioneros de microfluídica en papel - pero en ningún caso consideraba el impacto sobre la sensibilidad obtenida en la respuesta. Así, esta tesis doctoral resulta pionera al realizar un estudio sistemático

de la respuesta amperométrica de un SPE en contacto con diferentes materiales y mediadores redox de distinta carga eléctrica. Los resultados obtenidos muestran como uno de los sustratos más utilizados en la literatura – el Whatman 1- provoca una importante disminución de la señal amperométrica en comparación a la obtenida en un fluido libre y por lo tanto resulta totalmente desaconsejable como sustrato de este tipo de test. Por otra parte, la fibra de vidrio – material compuesto de fibras muy finas que le confieren una porosidad muy elevada- permite obtener respuestas muy similares a la de un medio libre. Cabe destacar que en el caso de la nitrocelulosa – el material usado en la zona de detección en los test de flujo lateral comerciales - a pesar de presentar una estructura con poros mucho menores que la fibra de vidrio, también se obtienen corrientes similares a tiempos cortos con respecto a las de un medio libre. Pasados los primeros diez segundos la corriente registrada decae de manera significativa debido al efecto de capa-fina por causa del grosor del papel. Por lo tanto, se puede concluir que a la hora de diseñar un ePAD, resulta de vital importancia llevar a cabo una caracterización de la respuesta amperométrica de los sensores en los materiales seleccionados para evaluar si existe impacto en la señal registrada. En el estudio realizado, la fibra de vidrio se reveló como un material de alta porosidad que permite realizar cronoamperometrías sin prácticamente pérdida de señal, por lo que resulta un material muy recomendable como constituyente de un ePAD. Por otra parte, en el caso que fuera necesario hacer uso de otro material para poder, por ejemplo, fisisorber biomoléculas, resulta conveniente hacer uso de la nitrocelulosa, teniendo en cuenta que la respuesta cronoamperométrica debe registrarse durante los primeros segundos de medida.

- **Se ha desarrollado un inmunosensor autoalimentado basado en papel capaz de cuantificar la señal con un voltaje de salida mayor de 1.5 V y con una potencia suficiente para alimentar una**

circuitería minimalista. Aunque existen algunos desarrollos en la literatura de inmunoensayo autoalimentado, todos ellos se basan en electrodos de tipo enzimático, lo cual limita el voltaje generado a valores por debajo de 1V. En el diseño del dispositivo de esta tesis, se realizó un cambio de paradigma al introducir como ánodo y electrodo no limitante una tira de Mg, mientras que en el cátodo se implementó un inmunoensayo sobre nitrocelulosa con un sándwich de anticuerpos para la detección de CRP. Los anticuerpos de captura de CRP estaban marcados con la enzima HRP, encargada de realizar la oxidación de un mediador redox (en este caso hidroquinona) utilizando H_2O_2 como sustrato. Esta configuración permite configurar una batería en la cual la potencia generada es proporcional a la concentración de anticuerpos de captura del analito presente en la muestra. Cabe destacar, que es el único trabajo reportado hasta la fecha capaz de proporcionar voltajes operativos por encima de 1V. Para demostrar su funcionamiento como fuente de energía en modo autónomo, el sistema se caracterizó mediante su conexión a una resistencia (manera más sencilla de operar una batería), obteniendo diferentes voltajes para diferentes concentraciones de analito. De esta manera se consigue substituir a un potencióstato por un sistema mucho más sencillo.

- **La sustitución de enzimas como marca electroquímica del inmunoensayo por nanopartículas inorgánicas de cerio es una alternativa viable para aumentar la robustez del sistema.** Durante el desarrollo del inmunosensor autoalimentado, se hizo evidente que el uso de una enzima como marca de los anticuerpos presentaba diversos problemas que posiblemente harían muy difícil su implementación en un dispositivo de diagnóstico rápido. En primer lugar, la necesidad de aportar un sustrato a la enzima añade una complejidad de uso que posiblemente recaiga en el usuario del test (lo cual puede originar errores de operación) y a su vez requiere de una calibración de los anticuerpos por lotes, ya que las enzimas presentan gran variabilidad

en su actividad catalítica. Por esta razón, en esta tesis se estudió el comportamiento oxidativo de las nanopartículas de cerio como alternativa a las enzimas. Los resultados obtenidos muestran que, a diferencia de lo reportado, en medios ligeramente ácidos la nanocería no sólo presenta una elevada capacidad para oxidar una especie redox de manera consistente y repetitiva, sino que actúa como agente oxidante y no como agente catalítico. A pesar que inicialmente pueda parecer una desventaja, este efecto le confiere unas cualidades que superan con creces las limitaciones de las enzimas naturales para su implementación en ePADs, ya que una vez que la nanocería se consume no hace necesario parar la reacción como ocurre en un agente catalítico, natural o sintético. La implicación directa de este fenómeno es que su implementación futura en un dispositivo de diagnóstico rápido requiere una electrónica mucho más sencilla, lo cual conllevará una disminución del coste y una mayor sostenibilidad de la solución final.

Esta tesis abre camino hacia una maduración tecnológica en diferentes aspectos de los ePADs y abre las puertas hacia su futura aplicación en dispositivos reales. A partir de aquí, el desarrollo tecnológico puede continuar en diferentes direcciones, todas encaminadas a la consecución de un dispositivo de diagnóstico rápido digital y sostenible.

En primer lugar, la caracterización sistemática y posterior modelización de la respuesta amperométrica en sustratos de papel abre la posibilidad de estudiar el efecto que tiene la impresión de las tintas directamente sobre el sustrato de papel. Esto presenta claras ventajas desde el punto de vista de la implementación de flujos verticales, como el diseñado en el dispositivo de inmunoensayo autoalimentado. Aunque en esta tesis se ha presentado un primer prototipo funcional, existen diversos caminos de mejora. Es evidente que la implementación de un inmunoensayo de tipo sándwich directo permitiría disminuir los pasos y el tiempo de realización del ensayo. Además, el desarrollo

de distintas estrategias microfluídicas que permitan almacenar tanto los anticuerpos marcados como el mediador redox haría posible disminuir el número de pasos de operación. Finalmente, la sustitución de la marca enzimática de los anticuerpos por nanopartículas de óxido de cerio sería el paso natural que permitiría demostrar la viabilidad de un test robusto y digital sin necesidad de batería ni microprocesador.

Bibliografía

- [1] H. Malhotra, J. Radich, P. Garcia-Gonzalez, Meeting the needs of CML patients in resource-poor countries, *Hematology*. (2019) 433–442.
- [2] H.M. Yapa, T. Bärnighausen, Implementation science in resource-poor countries and communities, *Implement. Sci.* 13 (2018) 1–13.
- [3] R.E. Baker, A.S. Mahmud, I.F. Miller, M. Rajeev, F. Rasambainarivo, B.L. Rice, S. Takahashi, A.J. Tatem, C.E. Wagner, L.F. Wang, A. Wesolowski, C.J.E. Metcalf, Infectious disease in an era of global change, *Nat. Rev. Microbiol.* 20 (2021) 193–205.
- [4] L. Hwenda, The business case for vaccine and drug manufacturing in middle-income countries, *Lancet Glob. Heal.* 10 (2022) e944–e945.
- [5] A.B. Mariotto, L. Enewold, J. Zhao, C.A. Zeruto, K. Robin Yabroff, Medical care costs associated with cancer survivorship in the United States, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 29 (2020) 1304–1312.
- [6] D.E. Newman-Toker, K.M. McDonald, D.O. Meltzer, How much diagnostic safety can we afford, and how should we decide? A health economics perspective, *BMJ Qual. Saf.* 22 (2013) ii11.
- [7] R. MchPherson, M. Pincus, *Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 24th ed., Elsevier, 2021.
- [8] H. Kettler, K. White, S. Hawkes, *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections : key findings and recommendations*, 2004.

- [9] G. Oliver, On bedside urinary test, *Lancet*. 121 (1883) 139–140.
- [10] S. Smith, J.G. Korvink, D. Mager, K. Land, The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria, *RSC Adv.* 8 (2018) 34012–34034.
- [11] C. Wang, M. Liu, Z. Wang, S. Li, Y. Deng, N. He, Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices, *Nano Today*. 37 (2021) 101092.
- [12] A. St John, C.P. Price, Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing, *Clin Biochem Rev.* 35 (2014) 155–167.
- [13] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*. 13 (2013) 2210.
- [14] A. Nilghaz, D.H.B. Wicaksono, D. Gustiono, F.A. Abdul Majid, E. Supriyanto, M.R. Abdul Kadir, Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost waxpatterning technique, *Lab Chip*. 12 (2012) 209–218.
- [15] T. Ozer, C. McMahon, C.S. Henry, Advances in Paper-Based Analytical Devices, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 13 (2020) 85–109.
- [16] J.R.L. Ehrenkranz, Home and Point-of-Care Pregnancy Tests: A Review of the Technology, *Epidemiology*. 13 (2002) S15–S18.
- [17] A. Albasri, A. Van Den Bruel, G. Hayward, R.J. Mcmanus, J.P. Sheppard, J. Yvan, J. Verbakel, Impact of point-of-care tests in community pharmacies: a systematic review and meta-analysis, *BMJ Open*. 10 (2020) 34298.
- [18] R. Banerjee, A. Jaiswal, Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases, *Analyst*. 143 (2018) 1970–1996.
- [19] C.D. Chin, V. Linder, S.K. Sia, Commercialization of microfluidic

- point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*. 12 (2012) 2118.
- [20] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 1318–1320.
- [21] J.L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D.Y. Stevens, P. Yager, Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks, *Lab Chip*. 10 (2010) 2659–2665.
- [22] E. Fu, S.A. Ramsey, P. Kauffman, B. Lutz, P. Yager, Transport in two-dimensional paper networks, *Microfluid. Nanofluidics*. 10 (2011) 29–35.
- [23] L.M. Fu, Y.N. Wang, Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 107 (2018) 196–211.
- [24] J. Choi, A.J. Bandodkar, J.T. Reeder, T.R. Ray, A. Turnquist, S.B. Kim, N. Nyberg, A. Hourlier-Fargette, J.B. Model, A.J. Aranyosi, S. Xu, R. Ghaffari, J.A. Rogers, Soft, skin-integrated multifunctional microfluidic systems for accurate colorimetric analysis of sweat biomarkers and temperature, *ACS Sensors*. 4 (2019) 379–388.
- [25] G. Jenkins, Y. Wang, Y.L. Xie, Q. Wu, W. Huang, L. Wang, X. Yang, Printed electronics integrated with paper-based microfluidics: new methodologies for next-generation health care, *Microfluid. Nanofluidics*. 19 (2015) 251–261.
- [26] G.G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A.M. Stockton, E. Carrilho, Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review, *Anal. Chim. Acta*. 970 (2017) 1–22.
- [27] K.J. Land, D.I. Boeras, X.S. Chen, A.R. Ramsay, R.W. Peeling,

- REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes, *Nat. Microbiol.* 4 (2019) 46–54.
- [28] Accu-Tell (R) SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Cassette (RBD), (n.d.). [https://www.accubiotech.com/product-list-coronavirus-\(covid-19\).html](https://www.accubiotech.com/product-list-coronavirus-(covid-19).html) (accessed December 7, 2022).
- [29] Seralite®– FLC Serum assay, (n.d.). <https://www.abingdonhealth.com/products/seralite/technical-support/calibration-barcodes/> (accessed December 7, 2022).
- [30] Y. Huang, T. Xu, W. Wang, Y. Wen, K. Li, L. Qian, X. Zhang, G. Liu, Lateral flow biosensors based on the use of micro- and nanomaterials: a review on recent developments, *Microchim. Acta.* 187 (2020).
- [31] H.R. Boehringer, B.J. O’Farrell, Lateral Flow Assays in Infectious Disease Diagnosis, *Clin. Chem.* 68 (2021) 52–58.
- [32] QuikRead go Instrument, (n.d.). <https://www.aidian.eu/point-of-care/quikread-go/quikread-go-instrument#generally> (accessed December 7, 2022).
- [33] Analizador POC de detección de droga - SoToxa™, (n.d.). <https://www.medicalexpo.es/prod/abbott/product-67555-600991.html> (accessed December 7, 2022).
- [34] Prueba de embarazo ultratemprana digital, (n.d.). <https://es.clearblue.com/test-de-embarazo/ultratemprana-digital> (accessed December 7, 2022).
- [35] K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4155–4160.

-
- [36] S.W. Hu, S. Qiao, J. Bin Pan, B. Kang, J.J. Xu, H.Y. Chen, A paper-based SERS test strip for quantitative detection of Mucin-1 in whole blood, *Talanta*. 179 (2018) 9–14.
- [37] Y. Jiao, C. Du, L. Zong, X. Guo, Y. Han, X. Zhang, L. Li, C. Zhang, Q. Ju, J. Liu, H.D. Yu, W. Huang, 3D vertical-flow paper-based device for simultaneous detection of multiple cancer biomarkers by fluorescent immunoassay, *Sensors Actuators B Chem.* 306 (2020) 127239.
- [38] S. Song, S. Choi, S. Ryu, S. Kim, T. Kim, J. Shin, H. Il Jung, C. Joo, Highly sensitive paper-based immunoassay using photothermal laser speckle imaging, *Biosens. Bioelectron.* 117 (2018) 385–391.
- [39] R. Yang, F. Li, W. Zhang, W. Shen, D. Yang, Z. Bian, H. Cui, Chemiluminescence Immunoassays for Simultaneous Detection of Three Heart Disease Biomarkers Using Magnetic Carbon Composites and Three-Dimensional Microfluidic Paper-Based Device, *Anal. Chem.* 91 (2019) 13006–13013.
- [40] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, Electrochemical detection for paper-based microfluidics, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5821–5826.
- [41] V.N. Ataide, L.F. Mendes, L.I.L.M. Gama, W.R. De Araujo, T.R.L.C. Paixaõ, Electrochemical paper-based analytical devices: Ten years of development, *Anal. Methods*. 12 (2020) 1030–1054.
- [42] A. Perju, N. Wongkaew, Integrating high-performing electrochemical transducers in lateral flow assay, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 5535–5549.
- [43] E. Solhi, M. Hasanzadeh, P. Babaie, Electrochemical paper-based analytical devices (ePADs) toward biosensing: Recent advances and challenges in bioanalysis, *Anal. Methods*. 12 (2020) 1398–1414.

- [44] Y. Sun, Q. Jiang, F. Chen, Y. Cao, Paper-based electrochemical sensor, *Electrochem. Sci. Adv.* 2 (2022) 1–16.
- [45] S.L. Moura, C.G. Martín, M. Martí, M.I. Pividori, Electrochemical immunosensing of nanovesicles as biomarkers for breast cancer, *Biosens. Bioelectron.* 150 (2020) 111882.
- [46] J.J. Ezenarro, N. Párraga-Niño, M. Sabrià, F.J. Del Campo, F.X. Muñoz-Pascual, J. Mas, N. Uria, Rapid Detection of *Legionella pneumophila* in Drinking Water, Based on Filter Immunoassay and Chronoamperometric Measurement, *Biosensors.* 10 (2020) 102.
- [47] C. Gonzalez-Solino, M. Di Lorenzo, Enzymatic Fuel Cells: Towards Self-Powered Implantable and Wearable Diagnostics, *Biosensors.* 8 (2018) 11.
- [48] I. Shitanda, Y. Morigayama, R. Iwashita, H. Goto, T. Aikawa, T. Mikawa, Y. Hoshi, M. Itagaki, H. Matsui, S. Tokito, S. Tsujimura, Paper-based lactate biofuel cell array with high power output, *J. Power Sources.* 489 (2021) 229533.
- [49] Y. Wang, L. Zhang, P. Zhao, S. Ge, M. Yan, J. Yu, Visual distance readout to display the level of energy generation in paper-based biofuel cells: application to enzymatic sensing of glucose, *Microchim. Acta.* 186 (2019) 1–9.
- [50] A. Pal, H.E. Cuellar, R. Kuang, H.F.N. Caurin, D. Goswami, R. V. Martinez, Self-Powered, Paper-Based Electrochemical Devices for Sensitive Point-of-Care Testing, *Adv. Mater. Technol.* 2 (2017) 1700130.
- [51] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley and Sons, 2008.
- [52] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry Principles, Methods, and*

- Applications, Oxford University Press, 2005.
- [53] R. Holze, *Experimental Electrochemistry: A Laboratory Textbook*, Wiley-VCH Verlag, 2019.
- [54] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Basic Potential Step Methods*, in: *Electrochem. Methods Fundam. Appl.*, Wiley, 2001.
- [55] C. Lefrou, P. Fabry, J.C. Poignet, *Electrochemistry: The basics, with examples*, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [56] R.G. Compton, C.E. Banks, *Understanding Voltammetry*, Third ed., World Scientific (Europe), 2018.
- [57] J.M. Pingarrón, J. Labuda, J. Barek, C.M.A. Brett, M.F. Camões, M. Fojta, D.B. Hibbert, Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019), *Pure Appl. Chem.* 92 (2020) 641–694.
- [58] M.U. Ahmed, M.M. Hossain, M. Safavieh, Y.L. Wong, I.A. Rahman, M. Zourob, E. Tamiya, Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes, *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (2016) 495–505.
- [59] V. Caratelli, E. Di Meo, N. Colozza, L. Fabiani, L. Fiore, D. Moscone, F. Arduini, Nanomaterials and paper-based electrochemical devices: merging strategies for fostering sustainable detection of biomarkers, *J. Mater. Chem. B.* 10 (2022) 9021–9039.
- [60] R.H. Tang, L.N. Liu, S.F. Zhang, X.C. He, X.J. Li, F. Xu, Y.H. Ni, F. Li, A review on advances in methods for modification of paper supports for use in point-of-care testing, *Microchim. Acta.* 186 (2019) 1–25.
- [61] P. Wang, L. Ge, M. Yan, X. Song, S. Ge, J. Yu, Paper-based three-dimensional electrochemical immunodevice based on multi-walled

- carbon nanotubes functionalized paper for sensitive point-of-care testing, *Biosens. Bioelectron.* 32 (2012) 238–243.
- [62] M. Safavieh, V. Kaul, S. Khetani, A. Singh, K. Dhingra, M.K. Kanakasabapathy, M.S. Draz, A. Memic, D.R. Kuritzkes, H. Shafiee, Paper microchip with a graphene-modified silver nano-composite electrode for electrical sensing of microbial pathogens, *Nanoscale.* 9 (2017) 1852–1861.
- [63] C.M. Moreira, S. V. Pereira, J. Raba, F.A. Bertolino, G.A. Messina, Paper-based enzymatic platform coupled to screen printed graphene-modified electrode for the fast neonatal screening of phenylketonuria, *Clin. Chim. Acta.* 486 (2018) 59–65.
- [64] F.H. Cincotto, E.L. Fava, F.C. Moraes, O. Fatibello-Filho, R.C. Faria, A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers, *Talanta.* 195 (2019) 62–68.
- [65] E.L. Fava, T.A. Silva, T.M. do Prado, F.C. de Moraes, R.C. Faria, O. Fatibello-Filho, Electrochemical paper-based microfluidic device for high throughput multiplexed analysis, *Talanta.* 203 (2019) 280–286.
- [66] A. Määttänen, U. Vanamo, P. Ihalainen, P. Pulkkinen, H. Tenhu, J. Bobacka, J. Peltonen, A low-cost paper-based inkjet-printed platform for electrochemical analyses, *Sensors Actuators B Chem.* 177 (2013) 153–162.
- [67] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, F. Impellizzieri, E. Piccin, G. Bontempelli, Pencil-drawn paper supported electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices, *Electrophoresis.* 34 (2013) 2085–2091.
- [68] C.Y. Lee, K.F. Lei, S.W. Tsai, N.M. Tsang, Development of graphene-based sensors on paper substrate for the measurement of pH value of

- analyte, *BioChip J.* 10 (2016) 182–188.
- [69] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P.J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 3635–3642.
- [70] J. Wang, B. Tian, V.B. Nascimento, L. Angnes, Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks, *Electrochim. Acta.* 43 (1998) 3459–3465.
- [71] K. Grennan, A.J. Killard, M.R. Smyth, Physical characterizations of a screen-printed electrode for use in an amperometric biosensor system, *Electroanalysis.* 13 (2001) 745–750.
- [72] D. Martín-Yerga, A. Costa-García, P.R. Unwin, Correlative Voltammetric Microscopy: Structure-Activity Relationships in the Microscopic Electrochemical Behavior of Screen Printed Carbon Electrodes, *ACS Sensors.* 4 (2019) 2173–2180.
- [73] G. Cui, Jae Hyun Yoo, Joung Su Lee, J. Yoo, Jung Hee Uhm, Geun Sig Cha, H. Nam, Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes, *Analyst.* 126 (2001) 1399–1403.
- [74] J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslun, O. Hammerich, J.M. Pingarrón, Electrochemical Activation of Screen-printed Carbon Strips, *Analyst.* 121 (1996) 345–350.
- [75] A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, Electrochemical characterization of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2021–2039.
- [76] I.C. Samper, A. Sánchez-Cano, W. Khamcharoen, I. Jang, W. Siangproh, E. Baldrich, B.J. Geiss, D.S. Dandy, C.S. Henry,

- Electrochemical Capillary-Flow Immunoassay for Detecting Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Antibodies at the Point of Care, *ACS Sensors*. 6 (2021) 4067–4075.
- [77] X. Mao, M. Baloda, A.S. Gurung, Y. Lin, G. Liu, Multiplex electrochemical immunoassay using gold nanoparticle probes and immunochromatographic strips, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1636–1640.
- [78] B. Tjaden, D.P. Finegan, J. Lane, D.J.L. Brett, P.R. Shearing, Contradictory concepts in tortuosity determination in porous media in electrochemical devices, *Chem. Eng. Sci.* 166 (2017) 235–245.
- [79] Optimize Your Multiphysics Models with the Optimization Module, (n.d.). <https://www.comsol.com/optimization-module> (accessed December 7, 2022).
- [80] J. Pablo Esquivel, P. Alday, O.A. Ibrahim, B. Fernández, E. Kjeang, N. Sabaté, J.P. Esquivel, P. Alday, N. Sabaté, O.A. Ibrahim, E. Kjeang, B. Fernández, A Metal-Free and Biotically Degradable Battery for Portable Single-Use Applications, *Adv. Energy Mater.* 7 (2017) 1700275.
- [81] L.L. Shen, G.R. Zhang, M. Biesalski, B.J.M. Etzold, Paper-based microfluidic aluminum–air batteries: toward next-generation miniaturized power supply, *Lab Chip*. 19 (2019) 3438–3447.
- [82] P. Yang, J. Li, S.W. Lee, H.J. Fan, Printed Zinc Paper Batteries, *Adv. Sci.* 9 (2022) 2103894.
- [83] M. Mohammadifar, I. Yazgan, J. Zhang, V. Kariuki, O.A. Sadik, S. Choi, G.M. Biobatteries Mohammadifar, S. Choi, I. Yazgan, J. Zhang, V. Kariuki, O.A. Sadik, Green Biobatteries: Hybrid Paper–Polymer Microbial Fuel Cells, *Adv. Sustain. Syst.* 2 (2018) 1800041.

-
- [84] I. Shitanda, Y. Fujimura, T. Takarada, R. Suzuki, T. Aikawa, M. Itagaki, S. Tsujimura, Self-Powered Diaper Sensor with Wireless Transmitter Powered by Paper-Based Biofuel Cell with Urine Glucose as Fuel, *ACS Sensors*. 6 (2021) 3409–3415.
- [85] S.K. Sailapu, E. Macchia, I. Merino-Jimenez, J.P. Esquivel, L. Sarcina, G. Scamarcio, S.D. Minter, L. Torsi, N. Sabaté, Standalone operation of an EGO-FET for ultra-sensitive detection of HIV, *Biosens. Bioelectron.* 156 (2020) 112103.
- [86] D. Pankratov, L. Ohlsson, P. Gudmundsson, S. Halak, L. Ljunggren, Z. Blum, S. Shleev, Ex vivo electric power generation in human blood using an enzymatic fuel cell in a vein replica, *RSC Adv.* 6 (2016) 70215–70220.
- [87] Y. Wang, L. Zhang, K. Cui, S. Ge, P. Zhao, J. Yu, Paper-Supported Self-Powered System Based on a Glucose/O₂ Biofuel Cell for Visual MicroRNA-21 Sensing, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 11 (2019) 5114–5122.
- [88] J. Cheng, Y. Han, L. Deng, S. Guo, Carbon nanotube-bilirubin oxidase bioconjugate as a new biofuel cell label for self-powered immunosensor, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11782–11788.
- [89] F. Conzuelo, J. Vivekananthan, S. Pöller, J.M. Pingarrón, W. Schuhmann, Immunologically Controlled Biofuel Cell as a Self-Powered Biosensor for Antibiotic Residue Determination, *ChemElectroChem*. 1 (2014) 1854–1858.
- [90] C. Gu, P. Gai, T. Hou, H. Li, C. Xue, F. Li, Enzymatic Fuel Cell-Based Self-Powered Homogeneous Immunosensing Platform via Target-Induced Glucose Release: An Appealing Alternative Strategy for Turn-On Melamine Assay, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 35721–35728.

- [91] S. Li, Y. Wang, S. Ge, J. Yu, M. Yan, Self-powered competitive immunosensor driven by biofuel cell based on hollow-channel paper analytical devices, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 18–24.
- [92] P. Gai, R. Song, C. Zhu, Y. Ji, W. Wang, J.R. Zhang, J.J. Zhu, Ultrasensitive self-powered cytosensors based on exogenous redox-free enzyme biofuel cells as point-of-care tools for early cancer diagnosis, *Chem. Commun.* 51 (2015) 16763–16766.
- [93] Q. Li, Y. Xu, J. Qi, X. Zheng, S. Liu, D. Lin, L. Zhang, P. Liu, B. Li, L. Chen, A self-powered rotating paper-based analytical device for sensing of thrombin, *Sensors Actuators B Chem.* 351 (2022) 130917.
- [94] T.A. Pearson, G.A. Mensah, R.W. Alexander, J.L. Anderson, R.O. Cannon, M. Criqui, Y.Y. Fadl, S.P. Fortmann, Y. Hong, G.L. Myers, N. Rifai, S.C. Smith, K. Taubert, R.P. Tracy, F. Vinicor, Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association, *Circulation.* 107 (2003) 499–511.
- [95] D. Wild, E. Kodak, *The Immunoassay Handbook*, Elsevier Ltd, 2013.
- [96] D. Chakraborty, R.P. Choudhury, M. Schönhoff, Adsorption of Aromatic Alcohols into the Walls of Hollow Polyelectrolyte Capsules, *Langmuir.* 26 (2010) 12940–12947.
- [97] I.C. Monge-Romero, M.F. Suárez-Herrera, Electrocatalysis of the hydroquinone/benzoquinone redox couple at platinum electrodes covered by a thin film of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Synth. Met.* 175 (2013) 36–41.
- [98] S. Noh, J. Kim, G. Kim, C. Park, H. Jang, M. Lee, T. Lee, Recent advances in crp biosensor based on electrical, electrochemical and optical methods, *Sensors.* 21 (2021).

-
- [99] D. Song, A. Bin Ma, J. Jiang, P. Lin, D. Yang, J. Fan, Corrosion behavior of equal-channel-angular-pressed pure magnesium in NaCl aqueous solution, *Corros. Sci.* 52 (2010) 481–490.
- [100] N. Birbilis, A.D. King, S. Thomas, G.S. Frankel, J.R. Scully, Evidence for enhanced catalytic activity of magnesium arising from anodic dissolution, *Electrochim. Acta.* 132 (2014) 277–283.
- [101] M.C. Turhan, Q. Li, H. Jha, R.F. Singer, S. Virtanen, Corrosion behaviour of multiwall carbon nanotube/magnesium composites in 3.5% NaCl, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 7141–7148.
- [102] W.C. Mak, V. Beni, A.P.F. Turner, Lateral-flow technology: From visual to instrumental, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 297–305.
- [103] K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, A competitive immunochromatographic assay for testosterone based on electrochemical detection, *Talanta.* 73 (2007) 886–892.
- [104] A.G. Ochoa-Ruiz, G. Parra, D. López-Espinoza, P. Astudillo, D. Galyamin, N. Sabaté, J.P. Esquivel, A.A. Vallejo-Cardona, Electrochemical Immunosensors: The Evolution from Elisa to E μ PADs, *Electroanalysis.* (2022).
- [105] A.S. Bommarius, M.F. Paye, Stabilizing biocatalysts, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6534–6565.
- [106] A. Arsalan, H. Younus, Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 1833–1847.
- [107] L.J. Jensen, D.W. Ussery, S. Brunak, Functionality of system components: Conservation of protein function in protein feature space, *Genome Res.* 13 (2003) 2444–2449.

- [108] G.F.D. Del Castillo, M. Koenig, M. Müller, K.J. Eichhorn, M. Stamm, P. Uhlmann, A. Dahlin, Enzyme Immobilization in Polyelectrolyte Brushes: High Loading and Enhanced Activity Compared to Monolayers, *Langmuir*. 35 (2019) 3479–3489.
- [109] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 577–583.
- [110] J. Wu, X. Wang, Q. Wang, Z. Lou, S. Li, Y. Zhu, L. Qin, H. Wei, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II), *Chem. Soc. Rev.* 48 (2019) 1004–1076.
- [111] H. Wei, L. Gao, K. Fan, J. Liu, J. He, X. Qu, S. Dong, E. Wang, X. Yan, Nanozymes: A clear definition with fuzzy edges, *Nano Today*. 40 (2021) 101269.
- [112] A. Khurana, P. Anchi, P. Allawadhi, V. Kumar, N. Sayed, G. Packirisamy, C. Godugu, Superoxide dismutase mimetic nanoceria restrains cerulein induced acute pancreatitis, *Nanomedicine*. 14 (2019) 1805–1825.
- [113] C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, W.T. Self, Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles, *Chem. Commun.* (2007) 1056–1058.
- [114] S. Singh, T. Dosani, A.S. Karakoti, A. Kumar, S. Seal, W.T. Self, A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties, *Biomaterials*. 32 (2011) 6745–6753.
- [115] J.D. Cafun, K.O. Kvashnina, E. Casals, V.F. Puentes, P. Glatzel, Absence of Ce³⁺ sites in chemically active colloidal ceria nanoparticles, *ACS Nano*. 7 (2013) 10726–10732.

-
- [116] T. Pirmohamed, J.M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A.S. Karakoti, J.E.S. King, S. Seal, W.T. Self, Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity, *Chem. Commun.* 46 (2010) 2736–2738.
- [117] Y. Yue, H. Wei, J. Guo, Y. Yang, Ceria-based peroxidase-mimicking nanozyme with enhanced activity: A coordination chemistry strategy, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 610 (2021) 125715.
- [118] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, S. Nath, J.M. Perez, Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles, *Angew. Chemie.* 121 (2009) 2344–2348.
- [119] S. Scirè, L. Palmisano, Cerium and cerium oxide: A brief introduction, in: *Cerium Oxide Synth. Prop. Appl.*, Elsevier, 2020: pp. 1–12.
- [120] A. Dhall, W. Self, Cerium oxide nanoparticles: A brief review of their synthesis methods and biomedical applications, *Antioxidants.* 7 (2018) 97.
- [121] V. Baldim, F. Bedioui, N. Mignet, I. Margail, J.F. Berret, The enzyme-like catalytic activity of cerium oxide nanoparticles and its dependency on Ce³⁺ surface area concentration, *Nanoscale.* 10 (2018) 6971–6980.
- [122] J.S.P. Cresi, M. Chiara Spadaro, S. D’Addato, S. Valeri, L. Amidani, F. Boscherini, G. Bertoni, D. Deiana, P. Luches, Contraction, cation oxidation state and size effects in cerium oxide nanoparticles, *Nanotechnology.* 28 (2017) 495702.
- [123] Y.W. Hartati, S.N. Topkaya, S. Gaffar, H.H. Bahti, A.E. Cetin, Synthesis and characterization of nanoceria for electrochemical sensing applications, *RSC Adv.* 11 (2021) 16216–16235.
- [124] R.M. Rakhmatullin, V. V. Semashko, S.L. Korableva, A.G. Kiiamov,

- A.A. Rodionov, R. Tschaggelar, J.A. van Bokhoven, C. Paun, EPR study of ceria nanoparticles containing different concentration of Ce³⁺ ions, *Mater. Chem. Phys.* 219 (2018) 251–257.
- [125] X. Xia, Y. Lan, J. Li, C. Chen, B. Xu, X. Luo, X. Mao, Facile synthesis of nanoceria by a molten hydroxide method and its photocatalytic properties, *J. Rare Earths.* 38 (2020) 951–960.
- [126] H. Cheng, S. Lin, F. Muhammad, Y.W. Lin, H. Wei, Rationally Modulate the Oxidase-like Activity of Nanoceria for Self-Regulated Bioassays, *ACS Sensors.* 1 (2016) 1336–1343.
- [127] P. Ni, X. Wei, J. Guo, X. Ye, S. Yang, On the origin of the oxidizing ability of ceria nanoparticles, *RSC Adv.* 5 (2015) 97512–97519.
- [128] K. Reed, A. Cormack, A. Kulkarni, M. Mayton, D. Sayle, F. Klaessig, B. Stadler, Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?, *Environ. Sci. Nano.* 1 (2014) 390–405.
- [129] L.C. Zhao, M.H. Guo, X.D. Li, Y.P. Huang, S.H. Wu, J.J. Sun, Molar Range Detection Based on Sideband Differential Absorption Spectroscopy with a Concentrated Reference, *Anal. Chem.* 89 (2017) 13429–13433.
- [130] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [131] B. Jiang, D. Duan, L. Gao, M. Zhou, K. Fan, Y. Tang, J. Xi, Y. Bi, Z. Tong, G.F. Gao, N. Xie, A. Tang, G. Nie, M. Liang, X. Yan, Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes, *Nat. Protoc.* 13 (2018) 1506–1520.
- [132] A.J. WINDER, H. HARRIS, New assays for the tyrosine hydroxylase

-
- and dopa oxidase activities of tyrosinase, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 317–326.
- [133] W.L. Waltz, S.S. Akhtar, R.L. Eager, Oxidation of Some Transition-Metal Cyanide Compounds by Hydroxyl Radical, *J. Chem.* 51 (1973) 2525.
- [134] Y. Xu, S.S. Mofarah, R. Mehmood, C. Cazorla, P. Koshy, C.C. Sorrell, Design strategies for ceria nanomaterials: untangling key mechanistic concepts, *Mater. Horizons.* 8 (2021) 102–123.
- [135] S.A. Hayes, P. Yu, T.J. O’Keefe, M.J. O’Keefe, J.O. Stoffer, The Phase Stability of Cerium Species in Aqueous Systems, *J. Electrochem. Soc.* 149 (2002) C623.
- [136] M. Pourbaix, *Atlas of Electrochemical Equilibria in-Aqueous Solutions*, Oxford, New York, 1966.