



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Estudio de propiedades
electrocatalíticas de nanopartículas de
paladio para su aplicación en
inmunosensores**

María Palomares Albarrán

Oviedo, Julio 2020

Resumen.

El interés por el empleo de nanopartículas (NPs) metálicas como marcas en inmunosensores electroquímicos, ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, debido principalmente a sus propiedades electroactivas/electrocatalíticas y a su biocompatibilidad. Además, cabe destacar que el empleo de NPs, presenta una serie de ventajas frente al uso de enzimas, las marcas tradicionalmente usadas en inmunosensores electroquímicos: síntesis más económica, mayor estabilidad y detección más sencilla, entre otras. Esto ha dado lugar a múltiples aplicaciones en diversos campos de investigación, como el diagnóstico clínico y el control medioambiental y alimentario. Sin embargo, la mayor limitación de estos sistemas inmunosensores radica en la necesidad de medios ácidos/oxidantes para la detección de la mayoría de las NPs metálicas utilizadas como marca. Esto ha hecho que se hayan propuesto recientemente nuevas estrategias de detección de NPs, basadas en sus propiedades electrocatalíticas sobre reacciones que tienen lugar a pH neutro, como la reacción de oxidación del agua (WOR).

En particular, las nanopartículas de paladio (PdNPs), son conocidas por propiedades que permiten su uso como agentes fototérmicos, agentes fotoacústicos y portadores de fármacos. Sin embargo, su gran potencial relacionado con propiedades electrocatalíticas ha sido poco estudiado para su uso como marcas en inmunosensores electroquímicos.

En este contexto, el presente trabajo se centra en la síntesis y caracterización de PdNPs y el estudio de sus propiedades electrocatalíticas sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR). Esta reacción tiene lugar a pH neutro, lo que permite la determinación de las NPs en el mismo medio en el que ocurre la reacción inmunológica.

La síntesis de PdNPs se llevó a cabo por reducción de una sal de paladio por acción de etanol, empleando Polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante. Las NPs obtenidas se caracterizaron por microscopía electrónica e ICP-MS, observando suspensiones estables de NPs con un tamaño medio entre 2.5 y 4 nm, con un contenido en paladio de 2.87 mM. Su actividad electrocatalítica sobre la ORR se evaluó por voltamperometría cíclica y cronoamperometría, siendo esta última técnica la utilizada para las medidas cuantitativas. El método optimizado permite la determinación de PdNPs en un intervalo de concentraciones comprendido entre 1×10^{-4} y 5×10^{-3} mM, con un límite de detección de 3×10^{-5} mM.

La sencillez y sensibilidad del método propuesto, permite pensar en su aplicación en inmunosensores electroquímicos en los que se usen estas NPs como marca.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación en marcha en el Grupo de Nanobioanálisis de la Universidad de Oviedo, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, cuyo objetivo final es el desarrollo de biosensores electroquímicos basados en nanomateriales para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Índice

Resumen.	2
Tabla de abreviaturas.	6
1. Introducción.	7
1.1 Inmunosensores: ventajas respecto a otro tipo de inmunoensayos.	7
1.2 Inmunosensores electroquímicos: Ventajas respecto a otro tipo de detección.	7
1.2.1 Marcas enzimáticas: limitaciones.	8
1.2.2 Uso de nanopartículas como marcas: limitaciones de los métodos tradicionales de detección.	9
1.2.3 Propiedades de las nanopartículas de paladio (PdNPs): Efecto catalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR).	12
1.3 Demencia. Enfermedad de Alzheimer.	14
1.4 Enfermedad de Alzheimer: diagnóstico basado en detección de biomarcadores. Ventajas y limitaciones.	15
1.5 Uso de NPs como marca en biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.	18
2. Objetivos.	23
3. Experimental, resultados y discusión.	24
3.1 Instrumentación materiales y reactivos.	24
3.1.1 Instrumentación y materiales.	24
3.1.2 Reactivos.	24
3.2 Métodos.	25
3.2.1 Síntesis de nanopartículas de paladio.	25
3.2.2 Caracterización de nanopartículas de paladio.	25
3.2.3 Análisis electroquímico de las nanopartículas de paladio.	26
- Evaluación del efecto electrocatalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno, mediante voltamperometría cíclica.	26
- Cuantificación mediante cronoamperometría.	27

3.3	Resultados y discusión.	27
3.3.1	Caracterización de las nanopartículas de paladio	27
3.3.2	Actividad electrocatalítica de las nanopartículas de paladio sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR).	28
3.3.3	Cuantificación de nanopartículas de paladio mediante cronoamperometría.	29
4.	Conclusiones y perspectivas de futuro.	34
5.	Bibliografía	35

Tabla de abreviaturas.

Abreviatura	Nombre completo
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
A β	β -amiloide
ALP	Fosfatasa alcalina
ASV	Voltamperometría de redisolución anódica.
CA	Cronoamperometría
CV	Voltamperometría cíclica
DFT	Demencia Frontotemporal
EA	Enfermedad de Alzheimer
GOx	Glucosa oxidasa
HOR	Reacción de oxidación del hidrógeno.
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LOD	Límite de detección
MOFs	Compuestos metal-orgánicos
NF	Neurofilamento
NIH	National Institute of Health
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORR	Reacción de reducción del oxígeno
PBS	Buffer fosfato salino
PVP	Polivinilpirrolidona
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
QDs	Quantum Dots
SPCEs	Electrodos serigrafados de carbono
SPR	Plasmón de resonancia superficial
TEM	Microscopio de transmisión de electrones
WOR	Reacción de oxidación del agua

1. Introducción.

1.1 Inmunosensores: ventajas respecto a otro tipo de inmunoensayos.

Un inmunosensor es un tipo de biosensor que utiliza la reacción inmunológica, es decir, una reacción de afinidad entre antígeno y anticuerpo, como reacción de reconocimiento molecular. En este tipo de biosensores, uno de los reactivos que participa en la reacción inmunológica, es decir, el antígeno (Ag) o el anticuerpo (Ac), es inmovilizado sobre la fase sensora que se encuentra situada en la superficie de un transductor, teniendo un buen control de la orientación, cantidad y actividad de la biomolécula que se inmoviliza. De este modo, se minimizan los problemas de adsorciones inespecíficas, lo que favorece que la reacción inmunológica tenga lugar de manera selectiva.

La principal diferencia con los inmunoensayos clásicos radica en que en éstos, la reacción inmunológica tiene lugar sobre una superficie sólida, como por ejemplo, el fondo de un tubo de ensayo o una placa multipocillo¹, mientras que en los inmunosensores esta reacción tiene lugar en la superficie de un transductor (en la capa selectiva), lo que permite detectar y cuantificar de manera directa el antígeno o anticuerpo objeto de estudio. Los inmunosensores, por tanto, resultan ser, dispositivos fáciles de utilizar, de automatizar, de miniaturizar y que tienen la capacidad de emplearse donde se requiera realizar un análisis en tiempo real. Esto solventa las principales desventajas de los inmunoensayos clásicos.² Actualmente, el término “inmunoensayo” se emplea para referirse a pruebas basadas en inmunoreacción, mientras que el término “inmunosensor” se emplea para describir el dispositivo completo de análisis.³

1.2 Inmunosensores electroquímicos: Ventajas respecto a otro tipo de detección.

Los inmunosensores se pueden clasificar en función de la naturaleza del transductor empleado, es decir, en función del tipo de señal analítica generada en el momento en el que se produce la reacción de reconocimiento molecular. Existen cuatro tipos de inmunosensores, en base al criterio de clasificación mencionado:⁴

- **Electroquímicos**

En este tipo de inmunosensores, el transductor mide un cambio electroquímico que tiene lugar como consecuencia de la reacción inmunológica. Dicho cambio, es proporcional a la concentración del analito que se quiera determinar. Los principales transductores electroquímicos son los amperométricos, potenciométricos, conductimétricos e impedimétricos.

- **Ópticos.**

En este tipo de inmunosensores, la detección de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo se produce a través de una señal óptica que se genera al producirse la reacción inmunológica, o bien mediante un cambio en las propiedades ópticas del medio (cambio en el índice de refracción), al formarse el complejo antígeno-anticuerpo.

- **Piezoeléctricos**

La señal se detecta al producirse un cambio de masa que tiene lugar cuando sucede la reacción inmunológica, es decir, al formarse el complejo antígeno-anticuerpo.

- **Térmicos**

La reacción inmunológica se detecta al medirse cambios de temperatura, como resultado de la reacción inmunológica. En la actualidad, estos inmunosensores están en desuso.⁵

El papel de los inmunosensores electroquímicos como dispositivos de análisis en diferentes sectores, como la agricultura, alimentación, análisis clínicos, control de calidad, análisis medioambiental e industrial, ha aumentado notablemente en los últimos años. Esto es debido a las ventajas que este tipo de inmunosensores presentan frente a los basados en otro tipo de detección: bajo coste, elevada sensibilidad, miniaturización, automatización, no requieren grandes volúmenes para el análisis, portabilidad, etc.^{6,7}

1.2.1 Marcas enzimáticas: limitaciones.

El formato de inmunoensayo empleado, para llevar a cabo la detección de la reacción inmunológica puede ser directo o indirecto. Los inmunosensores con detección directa (inmunosensores ópticos basados en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR), inmunosensor de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), inmunosensores de impedancias, etc.) son más simples que los inmunosensores con detección indirecta, debido a que no requieren de ninguna molécula indicadora para detectar la interacción entre antígeno y anticuerpo. La reacción inmunológica se detecta midiendo los cambios físicos que tienen lugar al formarse el complejo antígeno-anticuerpo en la superficie de la fase sensora. Sin embargo, tienen una menor sensibilidad. Por otro lado, en los inmunosensores con detección indirecta, se combina un reactivo que actúa como marca con el anticuerpo o antígeno de interés, para llevar a cabo su detección y cuantificación; en ocasiones se requiere del empleo de anticuerpos secundarios marcados, para llevar a cabo las medidas analíticas. En este tipo de inmunosensores, la señal que se mide es generada a partir de la marca, que se encuentra combinada con alguno de los reactivos inmunológicos, permitiendo una detección altamente sensible y versátil del analito de interés.^{8,9} Existen diversos reactivos que actúan como marcas,

de entre los que destacan: radioisótopos, enzimas, fluoróforos, moléculas quimioluminiscentes, moléculas electroactivas y nanopartículas (tabla 1).

Tabla 1. Marcadores empleados en inmunoensayos y en inmunosensores.

Tipo de marcador	Ejemplos más comunes de los marcadores
Radioisótopos	^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{125}I , ^{57}Co
Enzimas	Peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (ALP), glucosa oxidasa (GOx)
Fluoróforos	Fluoresceína, derivados de cianina
Moléculas quimioluminiscentes	Luminol y derivados
Moléculas electroactivas	Ferroceno, azul de metileno, metales (Au^{3+})
Nanopartículas	Metálicas (AuNP; AgNP), semiconductores (QDs)

En los inmunosensores electroquímicos, los reactivos más comúnmente empleados como marcas son las enzimas. Sin embargo, las enzimas naturales tienen limitaciones intrínsecas, que dificultan su empleo como marcas: baja estabilidad térmica y ambiental debido a la desnaturalización, baja conductividad, síntesis y purificaciones costosas y complicadas, además de la necesidad de condiciones estrictas para mantener la actividad enzimática. Esta serie de deficiencias en el empleo de las enzimas como marcas han promovido su sustitución, en los últimos años, por diferentes nanomateriales. Los nanomateriales más empleados como marcadores, en reacciones de reconocimiento molecular, son las nanopartículas.¹⁰

1.2.2 Uso de nanopartículas como marcas: limitaciones de los métodos tradicionales de detección.

Los recientes avances en nanotecnología, como, por ejemplo, la fabricación de nanopartículas (NPs) con propiedades fisicoquímicas muy específicas, se han traducido en el diseño de inmunosensores mejorados. Estos inmunosensores combinan la especificidad y versatilidad de los anticuerpos (y derivados) con la explotación de las propiedades intrínsecas de las NPs. Además de las NPs existen otra serie de nanomateriales, que se pueden emplear, bien para modificar la superficie de los transductores, o bien como marcadores en diferentes reacciones de reconocimiento molecular. De acuerdo con su estructura, los nanomateriales pueden ser, de dimensión 0 (0D) (Quantum dots (QDs), nanoclusters, NPs, fullerenos), 1D (nanotubos de carbono, nano-agujas), 2D (láminas de grafeno (GS), películas de oro nanoporoso (NPG)) y 3D (Metal-organic frameworks (MOFs)).¹¹

En el caso de los inmunosensores electroquímicos, las aplicaciones de los nanomateriales se dividen en dos categorías, en función del papel que ejerzan:¹²

- 1) Los nanomateriales pueden modificar la superficie de los transductores electroquímicos para i) mejorar sus propiedades electroquímicas: disminuir la corriente de fondo, mejorar la relación señal/ruido y aumentar la velocidad de la transferencia de electrones y ii) facilitar la inmovilización de los reactivos inmunológicos (anticuerpos o antígenos), ya que mejoran la capacidad de adsorción de las moléculas. De todo el conjunto de nanomateriales, uno de los más publicados en la literatura para la producción de inmunosensores son los nanotubos de carbono, de pared simple (CNTs) o multicapa (MWCNTs), inmovilizándose directamente sobre la superficie del transductor. Se emplean habitualmente para la modificación de los electrodos.
- 2) Los nanomateriales, sobre todo las NPs, se conjugan con los reactivos inmunológicos actuando como marca en las reacciones entre antígeno y anticuerpo. El empleo de nanomateriales como marcas de la reacción inmunológica resulta un avance hacia el desarrollo de inmunosensores electroquímicos ultrasensibles. Los reactivos inmunológicos marcados con nanomateriales pueden conservar su bioactividad e interactuar con sus contrapartes.

Aunque el presente trabajo se centra mayormente en los inmunosensores electroquímicos, el empleo de nanomateriales se encuentra extendido a otros tipos de biosensores.

Las NPs son nanomateriales OD y son el tipo de nanomateriales más empleados como marcas en inmunosensores. Existen diferentes tipos de NPs,^{11,13} siendo las más utilizadas en inmunosensores los Quantum Dots y las NPs metálicas:

- Los Quantum Dots (QDs) son NPs semiconductoras, formadas por elementos de los grupos II-VI O III-V de la tabla periódica. Poseen diferentes propiedades óptico-electrónicas dependiendo de su tamaño. En el campo de los inmunosensores, se suelen emplear como marcadores que generan una señal óptica debido a sus propiedades fluorescentes. Una ventaja significativa del empleo de Quantum Dots frente a las técnicas tradicionales de fluorescencia, es que éstos poseen propiedades fluorescentes, lo que los convierte en un sistema atractivo de detección en el campo diagnóstico-terapéutico. Sus propiedades electroactivas también se han explotado en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos.

- Las NPs metálicas juegan un papel importante en la fabricación de biosensores electroquímicos. Las propiedades de las NPs varían en función de su composición (metales nobles, aleaciones de metales nobles o de óxidos metálicos) y su morfología. Las nanopartículas más empleadas en inmunosensores electroquímicos son las de metales nobles (AuNPs, AgNPs, PdNPs, PtNPs...) debido a sus propiedades electroactivas y electrocatalíticas y a su biocompatibilidad. Las NPs de óxidos metálicos (Cu_2O , Fe_3O_4 ...), aun teniendo un menor rendimiento electrocatalítico, también se emplean en este campo, ya que su uso reduce el coste de la detección.

En general, el empleo de NPs metálicas en la fabricación de inmunosensores electroquímicos proporciona una amplificación de la señal y excelentes efectos electrocatalíticos, lo que da lugar a una mejora de la sensibilidad del ensayo.

Quizás el aspecto más relevante a destacar es que el empleo de las NPs como marca en inmunosensores electroquímicos presenta una serie de ventajas frente al uso de enzimas. Las principales ventajas son:

- Obtención más sencilla y generalmente más económica.
- Mayor estabilidad.
- Detección más sencilla, sin necesidad de condiciones tan restrictivas como las enzimas.
- Posibilidad de multidetección.

Además de en el campo de los inmunosensores, las NPs son de gran interés en diversos campos de investigación y de aplicación, entre los que se encuentran la biomedicina, la industria farmacéutica, la electrónica, el medio ambiente, etc.¹⁴

Es de gran relevancia destacar que los métodos tradicionales de detección electroquímica de las NPs se basan en su descomposición en medios ácidos/oxidantes agresivos, seguido de la detección de los iones generados mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV). A pesar de la elevada sensibilidad de la detección mediante ASV de los iones resultantes de la descomposición de las NPs, la necesidad de emplear reactivos peligrosos en este proceso ha limitado su aplicación práctica en inmunosensores, como una alternativa a los inmunosensores tradicionales basados en marcas enzimáticas.

1.2.3 Propiedades de las nanopartículas de paladio (PdNPs): Efecto catalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR).

A principios del siglo XXI, se expusieron diversos estudios que detallaban la estructura electrónica de los átomos de paladio, de los nanoclusters de paladio, así como de las nanopartículas de paladio (PdNPs), a partir de los que se logró una nueva comprensión de la actividad catalítica selectiva de este metal noble.

El paladio, cuyo símbolo representativo es Pd, es un elemento químico de número atómico 46 situado en el grupo 10 de la tabla periódica de los elementos. Su configuración electrónica en las capas de electrones más externas ($\text{Pd } 4d^{10}, 5s^0$) resulta ser muy diferente en comparación con las de los otros miembros del grupo 10 ($\text{Ni}; 3d^8 4s^2$; $\text{Pt } 5d^9 6s^1$ y $\text{Ds } 6d^9 7s^1$ o $6d^8 7s^2$). Además, es un metal de transición que forma parte de un grupo de elementos con propiedades físicas y químicas similares que se denomina grupo del platino, cuya densidad y punto de fusión es inferior que la del resto de los elementos del grupo.¹⁵

El elevado precio del paladio restringe su aplicación a gran escala. Aun siendo un material con notables propiedades catalíticas, mecánicas y electrónicas, los nanomateriales de paladio y los nanomateriales de aleaciones de Pd, han adquirido un gran interés principalmente a partir de la última década. En estos últimos años, se han empleado en una serie de aplicaciones que incluyen el aprovechamiento de las propiedades catalíticas del paladio sobre la formación de enlaces carbono-carbono, la hidrogenación y la oxidación, para la fabricación de productos farmacéuticos, el procesamiento de contaminantes ambientales y el control de emisiones, además de componer equipos eléctricos y actuar como reactivos de detección de diversos analitos en sensores.¹⁶

Las PdNPs poseen excelentes propiedades fisicoquímicas, como son su elevada estabilidad térmica, gran estabilidad química y notable actividad fotocatalítica, además de grandes propiedades electrónicas, físicas, mecánicas y ópticas. Asimismo, las PdNPs se pueden obtener con diversas formas y tamaños.

Las investigaciones realizadas han demostrado que las PdNPs tienen un potencial extraordinario como agentes fototérmicos, agentes fotoacústicos, agentes antimicrobianos/antitumorales, para ser portadores de fármacos, portadores de genes y para actuar como reactivos de detección en biosensores.

Una de las principales propiedades de las PdNPs está relacionada con su efecto catalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR), que se describe en la Ecuación 1:¹⁷



Esta reacción desempeña un papel importante en los dispositivos de conversión de energía, tales como las pilas de combustible de membrana de intercambio de protones (PEMFCs) y las baterías metal-aire.¹⁸ La comprensión, a nivel atómico, del mecanismo de la ORR se encuentra aún en sus primeras etapas, debido a la elevada complejidad de su cinética.¹⁹ Las diferentes hipótesis sobre el mecanismo de la electroreducción del oxígeno son las siguientes:

1. Reducción “directa” a H_2O (en medios ácidos) o a OH^- (en medios alcalinos). Ambas reducciones requieren de 4 electrones.
2. Una reducción del O_2 a H_2O_2 , lo que implica dos electrones.
3. Una vía en “serie” que implica una reducción con 2 y 4 electrones.
4. Una combinación de las anteriores vías.
5. Una ruta “interactiva” que incluye la difusión de especies de una ruta “en serie” a una ruta “directa”.
6. Un mecanismo asociativo que implica la absorción de O_2 molecular y la transferencia directa un protón/electrón a dicha especie y a OOH , que se descompone en O y OH^- .
7. Un mecanismo disociativo que implica la división del enlace O-O en O_2 y la hidrogenación de O atómico a OH^- y H_2O .

La ORR tiene cinética lenta debido a la dificultad de la activación del O_2 , de la ruptura del enlace O-O y de la eliminación del óxido, por lo que se han hecho muchos esfuerzos para producir catalizadores activos que aceleren la velocidad a la que ocurren dichas reacciones.¹⁹ Generalmente se han empleado como catalizadores de la reacción de reducción de oxígeno los materiales de platino (Pt) o materiales basados en este metal. Sin embargo, los materiales basados en Pt tienen una serie de inconvenientes, como cinética de transferencia de electrones lenta, suministro limitado y baja duración. Para superar las limitaciones de emplear los catalizadores de Pt para la reacción de reducción del oxígeno, se han explorado diferentes materiales como alternativa. Según diversos estudios, el paladio (Pd) es una alternativa ideal al Pt, ya que es más tolerante al metano, se encuentra en abundancia en la naturaleza y tiene junto al Pt una de las actividades electrocatalíticas más elevadas para la reacción de oxidación del hidrógeno (HOR) y para ORR. Por tanto, los nanomateriales de Pd, entre los que se encuentran las PdNPs, son excelentes catalizadores de la ORR.^{20,21}

Se han realizado otros estudios, a partir de los que se ha descubierto que la adición de un metal de transición temprana al Pd puede causar acortamiento de las distancias interatómicas

Pd-Pd, dando lugar a un cambio descendente en la parte central de la banda d y a un cambio en las estructuras electrónicas del Pd. Debido a estos cambios estructurales, la adsorción del OH se centraría en el segundo metal y la catálisis de la reacción ORR, empleando Pd, se volvería comparable a la de Pt. Actualmente se siguen estudiando diversos aspectos de este proceso, con el objeto de superar limitaciones relacionadas con la elevada temperatura necesaria para que se produzca la transformación estructural ($> 500\text{ }^{\circ}\text{C}$), que conduce a la agregación las nanopartículas.²²

En definitiva, las excelentes propiedades de las PdNPs, recogidas a lo largo de este apartado del trabajo, generan un gran interés en la aplicabilidad de dichas NPs en diversos campos.

1.3 Demencia. Enfermedad de Alzheimer.

La demencia es un síndrome que implica un deterioro progresivo de la memoria y que afecta también a una serie de habilidades cognitivas, como son, el lenguaje, la orientación, el razonamiento, la atención en algo concreto, etc. Además, en las personas con demencia, el deterioro cognitivo suele ir acompañado de cambios en la personalidad. Hay varias causas de demencias reversibles e irreversibles, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la causa más común de demencia (entre el 60 % y el 70% de los casos) en adultos pertenecientes a la tercera edad.²³

La EA fue descrita por primera vez en 1906 por un psiquiatra y neurólogo alemán llamado Alois Alzheimer. Actualmente se sabe que es una forma agresiva de demencia que se manifiesta con déficits en la memoria, en el lenguaje y con cambios en el comportamiento, además de tratarse de un problema de salud pública muy importante ya que según las estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de personas afectadas por Alzheimer se cuadruplicara en las próximas décadas, llegando a un total aproximado de 114 millones de pacientes en 2050.²⁴

Para realizar el diagnóstico de la EA se elabora la historia clínica ya que se debe descartar que haya alguna causa médica de deterioro (hipotiroidismo, hipovitaminosis...), se realiza una exploración neurológica y posteriormente, se evalúa la memoria y otras funciones mentales. Además, se realizan otras pruebas complementarias que permiten descartar otras causas de demencia. Una vez realizadas todas las pruebas, se emite el diagnóstico probable de la EA. A pesar de todo, resulta complicado el diagnóstico de la EA en estadios tempranos de la enfermedad. Una detección más temprana, proporcionaría un aumento de las posibilidades de

tratamiento de los enfermos de Alzheimer, pudiendo comenzar una terapia en una fase temprana de evolución de la enfermedad.^{25,26}

Actualmente, las técnicas empleadas para el diagnóstico de EA se basan en la neuroimagen o la detección y cuantificación de algunos biomarcadores relacionados con dicha enfermedad. Sin embargo, aún no se tiene un conocimiento claro de la procedencia de la enfermedad.

1.4 Enfermedad de Alzheimer: diagnóstico basado en detección de biomarcadores. Ventajas y limitaciones.

En medicina, un biomarcador es una característica somática específica a un cambio biológico medible que se encuentra relacionado con un estado de salud o enfermedad. En el año 2001, el National Institute of Health (NIH) con el propósito de delimitar las características que debía de reunir un biomarcador para ser definido como tal, estableció la definición de biomarcador como “una característica que es medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” y señalaba que “los biomarcadores pueden ser una sustancia bioquímica a partir de una muestra biológica, un registro o una prueba de imagen”. Por tanto, un biomarcador se puede emplear para diagnosticar una enfermedad, para establecer su gravedad, para seguir su progresión y para medir su respuesta frente a diferentes tratamientos.²⁷

La mayoría de los estudios realizados de biomarcadores en demencia, están enfocados en el diagnóstico de la EA. Dichos estudios, se realizan en general en pacientes con un diagnóstico clínico probable de EA (DTA) y en un menor número de casos, se verifica la enfermedad mediante autopsia. Existen diferentes biomarcadores de EA, algunos de los cuales se encuentran recogidos en la tabla 2 ²⁸. En esta tabla se distingue entre biomarcadores simples o complejos, dependiendo de si es un compuesto único o involucra una serie de compuestos. Además, se indica junto al biomarcador sus respectivos índices de sensibilidad y especificidad (definiéndose sensibilidad como la proporción entre la Tasa de Verdadero Positivo, sobre el total de los pacientes que tienen la enfermedad y especificidad como la proporción entre la Tasa de Verdaderos Negativos, sobre el total de pacientes que no tienen la enfermedad).

Tabla 2. Clasificación de algunos biomarcadores de EA en simples y complejos. Sensibilidad y especificidad de dichos biomarcadores.

		Sensibilidad	Especificidad
Biomarcadores simples	Presencia de APOE ϵ 4	65%	68%
	Atrofia neuronal mediante VBM	94%	89%
	Concentración de $A\beta_{1-42}$ en LCR	100%	94%
	Concentración de Tau Total en LCR	84%	94%
	Concentración de Tau Fosforilada en LCR	88%	97%
	Proporción de Tau Fosforilada y $A\beta_{42}$	88%	89%
	Conectividad funcional en DMN con índice GDF mediante fMRI	85%	77%
Biomarcadores complejos	Niveles bajos de $A\beta_{1-42}$, niveles altos de proteína tau total y tau fosforilada en LCR	94%	-
	Concentración de proteínas en suero asociadas a inflamación, remodelación citoesquelética y señalización celular, además de factores de crecimiento, hormonas etc... en combinación con factores edad, sexo, años de educación y genotipo ApoE.	94%	84%
	Combinación en LCR de $A\beta_{1-42}$ y tau total	88%	89%

Los biomarcadores más estudiados en el líquido cefalorraquídeo (LCR), para el diagnóstico de la EA, son los péptidos β -amiloide ($A\beta$) y la proteína tau.²⁹ En el LCR de muchos pacientes con EA se ha observado una disminución de los niveles de β -amiloide₄₂ y un aumento en los niveles de la proteína tau fosforilada. Por otro lado, los niveles de proteína tau en la demencia frontotemporal (DFT) podrían estar disminuidos. Existen otros biomarcadores, como, por ejemplo, los neurofilamentos (NF), cuya medición en LCR resulta útil para diferenciar la DFT de la EA de inicio precoz, debido a que los niveles de NF en DFT son superiores a los niveles de NF en EA de inicio precoz. Además, la determinación conjunta con los biomarcadores previamente mencionados aumenta la precisión del diagnóstico. La principal limitación del análisis de biomarcadores clásicos para el diagnóstico de la EA en LCR es su carácter invasivo y su coste excesivo, lo que dificulta su aplicación en la práctica clínica.³⁰

La sangre, a diferencia del LCR es un fluido más accesible, que se puede obtener de manera menos invasiva y que se puede emplear como origen de potenciales biomarcadores de diagnóstico para la EA. Además, los biomarcadores sanguíneos suponen un coste inferior y un menor tiempo a la hora de obtener la muestra. Sin embargo, existen limitaciones en la identificación de biomarcadores sanguíneos en la EA. Una de ellas estriba en que es una enfermedad lentamente progresiva y en la que no se conoce el grado de pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en algunos trabajos se ha descrito la existencia de disfunción de la barrera hematoencefálica en los pacientes con EA, lo que implica un intercambio de proteínas y otras moléculas entre el LCR y la sangre. Otra limitación es que la sangre es un fluido complejo y por tanto son necesarios protocolos estandarizados para preparar la muestra y su análisis.³¹

Se han intentado identificar biomarcadores de la enfermedad amiloidea en sangre periférica, debido a la creencia de que la amiloidogénesis es el principal motivo de la EA. Sin embargo, debido a la influencia de multitud de factores, resulta imposible reproducir muchos de los resultados, por lo que actualmente no se puede establecer un claro papel de A β como biomarcador plasmático.

La proteína tau plasmática podría ser un marcador inespecífico de neurodegeneración, al observarse un incremento de sus niveles en pacientes con ictus isquémico, traumatismo craneoencefálico y prionopatías. Pero la asociación descrita entre los niveles de tau plasmático y la atrofia en regiones que se encuentran afectadas específicamente en EA permite plantear dicha proteína como potencial marcador de cribado de EA precoz.

Además de los dos tipos de biomarcadores ya mencionados, los niveles de neurofilamento ligero (NF-L), se encuentran elevados en pacientes con EA y DCL y se encuentran asociados con el grado de deterioro cognitivo. Sin embargo, la elevación de los niveles de NF-L en plasma, no es específica de la EA, ya que se detecta en otras enfermedades neurodegenerativas, considerándose, más bien, un biomarcador sanguíneo de neurodegeneración.

Por otro lado, se han descubierto una serie de proteínas y genes directamente implicados con la EA, que se han valorado como posibles biomarcadores. Éstos, son conocidos como biomarcadores genéticos y son marcadores de rasgo, es decir, marcadores que determinan el padecimiento de un determinado trastorno, que aun en ausencia de síntomas e incluso antes de que la enfermedad eclosiona, identificarían al portador de dicha enfermedad, pero no de estado (o de diagnóstico), puesto que hay sujetos que presentan el biomarcador, pero no padecen la enfermedad.³² Los marcadores genéticos más exactos corresponden a las

mutaciones en tres genes que causan EA familiar de inicio precoz: PS1 en el cromosoma 14, PS2 en el cromosoma 1 y PPA en el cromosoma 21. Pero carece de sentido su determinación sistemática debido a que solo unos cientos de familias en todo el mundo presentan esta forma de EA. Sin embargo, existen una serie de genes que actúan como factor de riesgo para presentar EA. El más estudiado de estos genes es el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE), ya que, según diversos estudios, su presencia aumenta claramente el riesgo de desarrollar EA y de la conversión de DCL a EA. Los marcadores como el APOE pueden resultar de utilidad en ensayos clínicos, a la hora de reclutar muestras con una mayor probabilidad de desarrollar EA.³³

En resumen, la detección de biomarcadores específicos de la EA supondría un avance científico, ya que permitiría un diagnóstico en estadios más tempranos de la enfermedad. La principal limitación es que existe una gran variedad de biomarcadores y que actualmente no se tiene un conocimiento exacto de lo que implica su presencia en líquidos fisiológicos. Es decir, si son específicos de la EA, de demencia en general o de otro tipo de enfermedades neurodegenerativas.

1.5 Uso de NPs como marca en biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.

En las últimas décadas se han desarrollado diversas nanopartículas, de diferente composición, para el diagnóstico y la terapia de la EA. Las nanopartículas empleadas para el diagnóstico de la EA tienen como objetivo la detección de algún tipo de proteína relacionada con dicha enfermedad, de modo que se pueda llegar a entender mejor los mecanismos moleculares importantes y sus tratamientos.³⁴ Existen diversos estudios en los que se emplean NPs como marcas en biosensores electroquímicos para la detección de alguno de los biomarcadores de EA (mencionado en el anterior apartado). Algunos ejemplos representativos se exponen en esta sección.

En el año 2014, se publicó un trabajo en el que se sintetizaron y se caracterizaron nanopartículas de óxido de iridio (IrO_2 NPs) para su empleo como marcas electrocatalíticas en la detección de la proteína APOE.³⁵ Se realizó un inmunoensayo tipo sándwich, sobre micropartículas magnéticas con detección final basada en la reacción de oxidación del agua (WOR), catalizada por las IrO_2 NPs, alcanzando un límite de detección (LOD) de $20 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Las ventajas de estas NPs radican en su síntesis sencilla y en su excelente actividad catalítica sobre la WOR. Además, se postulan como excelentes candidatas para sistemas de detección dual electroquímica/óptica, debido a que absorben radiación Vis-UV a 590 nm.

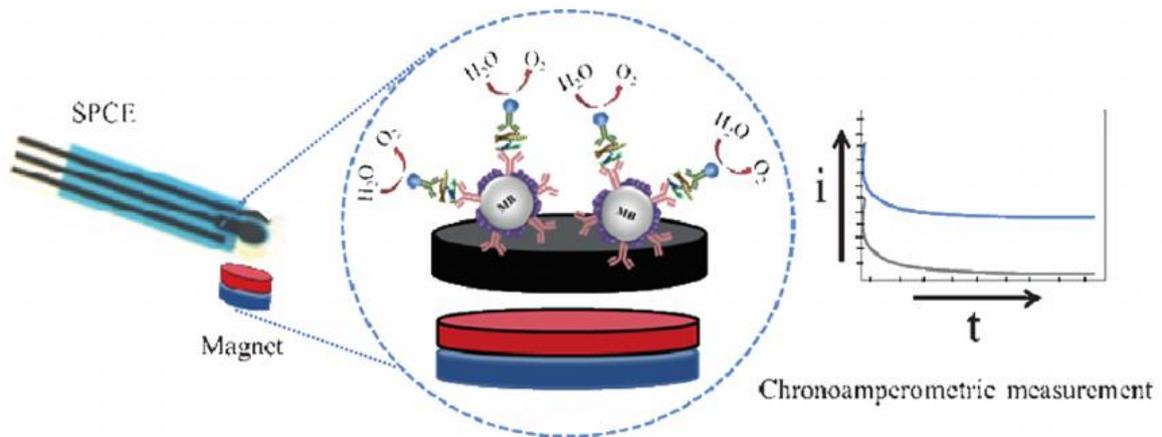


Figura 1. Detección electroquímica de APOE, mediante un inmunoensayo tipo sándwich sobre partículas magnéticas, basada en la catálisis de WOR por IrO_2 NPs. Adaptado de [35], con permiso.

Ese mismo año, se publicó otro trabajo en el que se consiguió detectar electroquímicamente el biomarcador APOE, con un LOD de 12.5 ng/mL, en muestras humanas de plasma empleando Quantum Dots (QDs) de CdSe@ZnS , como marcadores.³⁶ El inmunoensayo se realizó empleando unas microesferas magnéticas activadas como plataforma de preconcentración en un chip híbrido de polidimetilsiloxano-policarbonato (PDMS-PC) con electrodos serigrafados integrados. La detección electroquímica se llevó a cabo mediante voltamperometría de onda cuadrada e implicaba la reducción de los iones Cd^{2+} de la superficie de los QDs a Cd^0 y la reoxidación de Cd^0 a Cd^{2+} que es lo que genera la respuesta electroquímica que constituye la señal analítica.

Se han publicado diversos trabajos en los que se emplean nanopartículas de oro (AuNPs) como marcas electroquímicas para detectar biomarcadores de EA.³⁴ En el año 2015, se publicó un trabajo en el que se empleaban unas microesfera porosas (PMM) como plataforma de inmovilización de anticuerpos y captura de los biomarcadores ApoE y β -amiloide.³⁷ En el ensayo tipo sándwich realizado, se utilizaron AuNPs como marca, siendo éstas detectadas gracias a sus propiedades electrocatalíticas sobre la reacción de evolución de hidrógeno (HER) (Figura 2A), obteniéndose un LOD de 80 pg/mL en el caso de ApoE y de 19 pg/L para la proteína β -amiloide.

Las ventajas del uso de las AuNPs no estrictamente como marcas, si no como portadores/amplificadores de la señal de otras marcas, también se han explotado para la detección de biomarcadores del EA, como es el caso de los péptidos solubles de amiloide β (1-40/1-42).³⁸ Para ello se inmovilizó la gelsolina (proteína con afinidad específica para la determinación de $\text{A}\beta$) sobre AuNPs y mediante un ensayo tipo sándwich se llevó a cabo la determinación de $\text{A}\beta_{1-40/1-42}$ en cerebros de ratas normales y ratas con EA. La detección de la señal se llevó a cabo mediante el bioconjugado HRP-Au-gelsolin, diseñado mediante la

funcionalización de AuNPs, inmovilizando HRP y gelsolin en su superficie. Este bioconjugado provocaba una amplificación de la señal enzimática de la HRP, de modo que se podían medir fácilmente hasta 28 pM (Figura 2B).

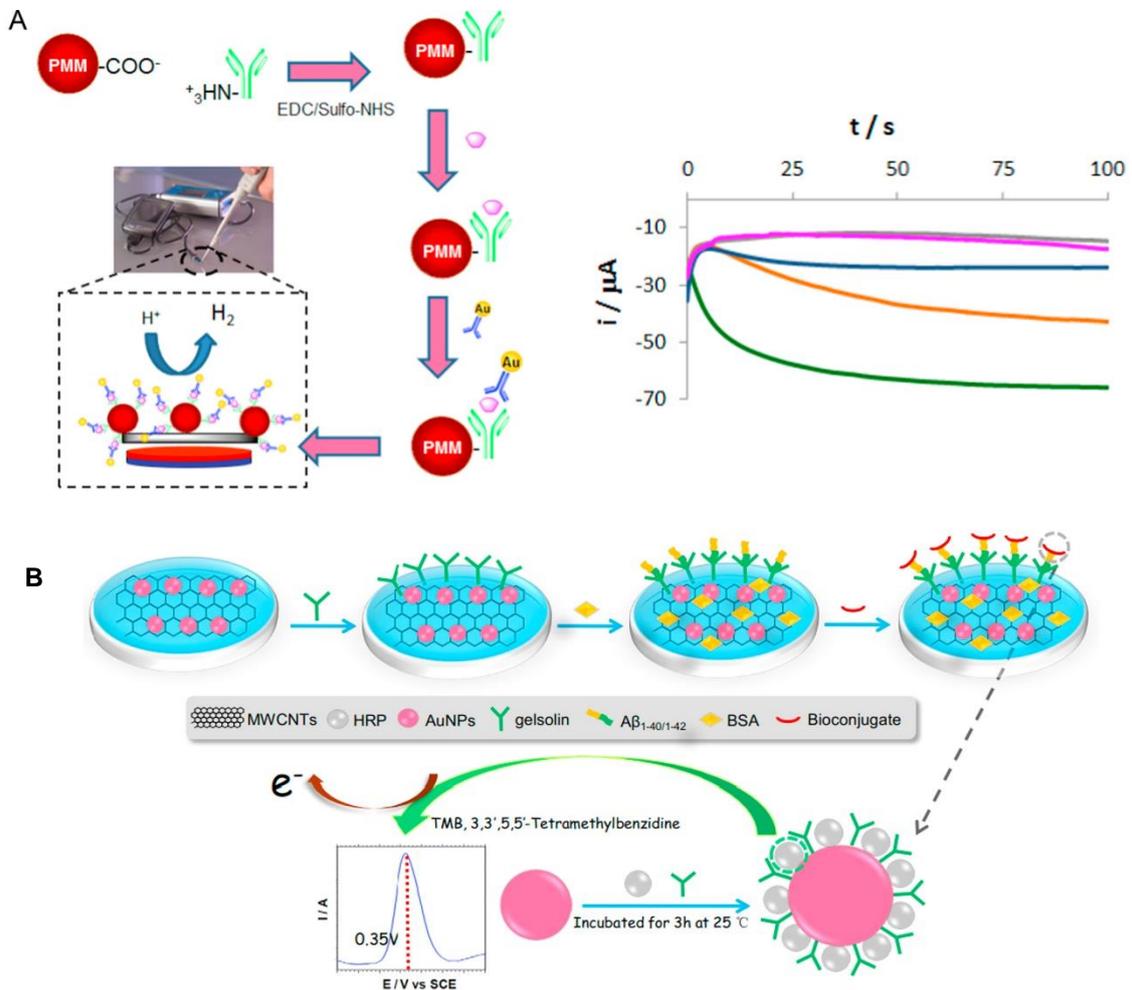


Figura 2. Esquemas de diferentes sistemas de detección electroquímicos para la determinación y cuantificación de diversos biomarcadores de EA empleando AuNPs como marcas. A) Detección de los biomarcadores ApoE y β -amiloide mediante un ensayo tipo sándwich, empleando AuNPs que catalizan la HER. Cronoamperogramas obtenidos para concentraciones crecientes del biomarcador β -amiloide (de arriba a abajo); B) Determinación de $\text{A}\beta_{1-40/1-42}$ mediante el bioconjugado HRP-Au-gelsolin, diseñado mediante la funcionalización de AuNPs, inmovilizando HRP y gelsolin en su superficie. Adaptado de [37] y [38] respectivamente, con permiso.

En el año 2017, se publicó un trabajo en el que se detectó electroquímicamente el biomarcador β -amiloide, en muestras de suero humanas, mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) utilizando un compuesto de ferroceno encapsulado en un compuesto organometálico de Zn (Fc-Zn-MOF) como marca, obteniendo un límite de detección de 0.03

pg/mL.³⁹ Previamente el electrodo sobre el que tiene lugar la reacción inmunológica es modificado con dendrímico de poli (amidoamina), grafeno y nanopartículas de oro (AuNPs/PAMAM-Gra) lo que mejora la señal.

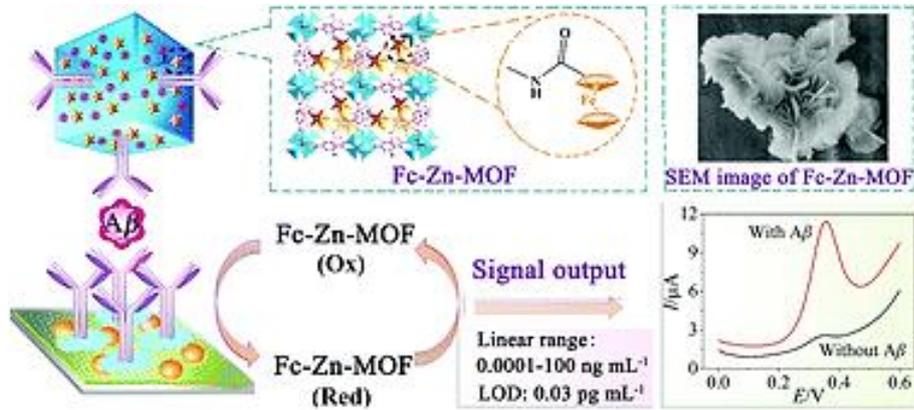


Figura 3. Esquema del inmunosensor y de los resultados obtenidos en la detección del biomarcador β -amiloide mediante SWV empleando Fc-Zn-MOFs como marcas. Adaptado de [39], con permiso.

Muy recientemente, se ha publicado un trabajo, en el que se emplearon unas NPs bifuncionales núcleo@corteza de Au@Pt/AuNPs como nuevas marcas en inmunosensores electroquímicos, aplicadas a la detección de un biomarcador de la EA (Figura 4).⁴⁰ El empleo de dichas NPs genera una mayor sensibilidad en la detección debido a que la sinergia entre los metales Au y Pt conduce a una mayor actividad catalítica en la reacción de oxidación del agua (WOR), que es monitorizada cronamperométricamente. El método electrocatalítico empleado en el trabajo se aplicó para la cuantificación del péptido p53 alterado conformacionalmente, un biomarcador de la EA, mediante la realización de un inmunoensayo competitivo sobre micropartículas magnéticas. La ventaja que presenta el método empleado en el trabajo, con respecto a los métodos comunes de detección electroquímica, es que la generación de la señal sucede en el mismo medio neutro en el que tiene lugar el inmunoensayo.

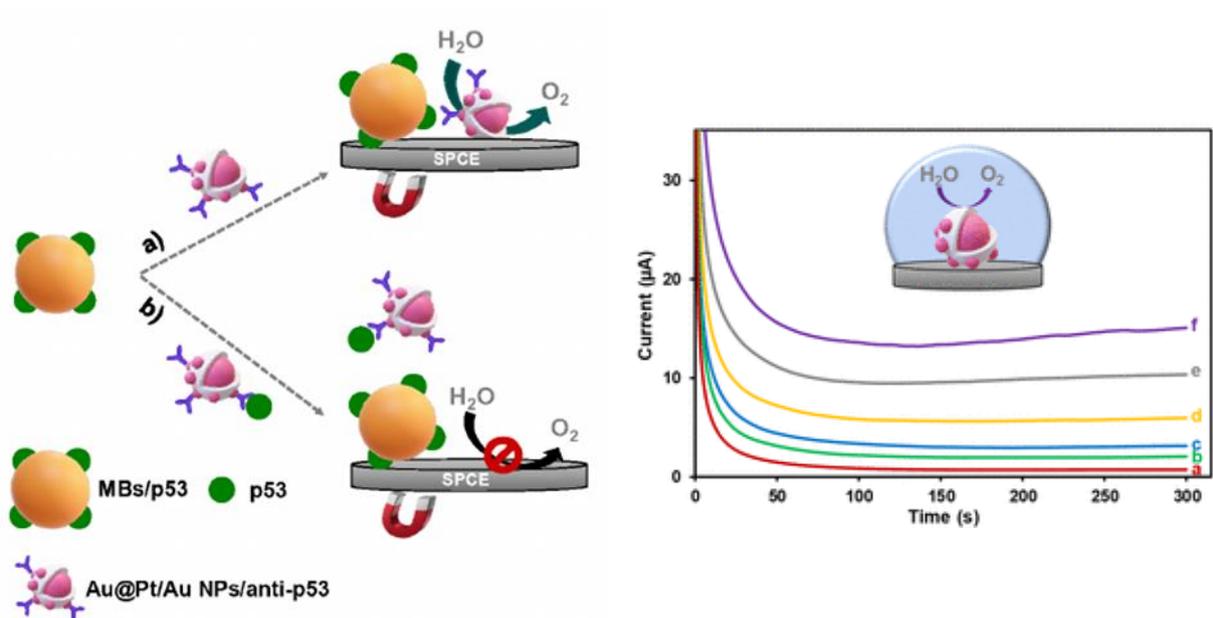


Figura 4. Representación esquemática del inmunoensayo competitivo para la detección del biomarcador p53 alterado conformacionalmente, empleando como marca Au@Pt/AuNPs, que se detectan a través de su efecto electrocatalítico sobre la reacción de oxidación del agua. Cronoamperogramas obtenidos a 1.35 V durante 300 s para el blanco y concentraciones crecientes de las Au@Pt/AuNPs. Adaptado de [40], con permiso.

2. Objetivos.

En este trabajo se propone el estudio de las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de paladio (PdNPs), que permitan su detección directa, sin necesidad de descomposición de la nanopartícula. En particular, se estudiará su efecto electrocatalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR), que tiene lugar a pH neutro. A partir de este efecto, se pretende optimizar un método electroanalítico que permita cuantificar estas nanopartículas de manera sensible.

Esta estrategia de detección será de gran interés para la posterior aplicación de dichas nanopartículas como marcas en biosensores. La detección a pH neutro permitirá su determinación en el mismo medio en el que ocurren las reacciones inmunológicas, sin la necesidad de reactivos adicionales. Esto será de gran relevancia para el desarrollo de sistemas biosensores altamente integrados.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación en marcha en el Grupo de Nanobioanálisis de la Universidad de Oviedo, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, cuyo objetivo final es el desarrollo de biosensores electroquímicos basados en nanomateriales, para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, y previo al trabajo experimental, se propone la realización de un trabajo de revisión bibliográfica sobre el uso de nanopartículas como marca en biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (recogido en la sección de introducción de este trabajo).

3. Experimental, resultados y discusión.

3.1 Instrumentación materiales y reactivos.

3.1.1 Instrumentación y materiales.

La caracterización de las nanopartículas sintetizadas se llevó a cabo mediante el empleo de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS), espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), voltamperometría cíclica (CV) y cronoamperometría (CA).

- El ICP-MS empleado fue el triple cuadrupolo 8900, ICP-QQQ de la empresa Aligent Technologies (Estados Unidos de América y Canadá).
- El equipo empleado para medir la DLS fue el Zetasizer Nano ZS (Reino Unido/Países Bajos).
- El equipo empleado para la obtención de las micrografías de TEM fue un JEOL JEM 2100F HRTEM (Estados Unidos de América) y el voltaje de aceleración utilizado fue de 200 kV.
- Las medidas electroquímicas se realizaron con electrodos serigrafados de carbono (SPCE) de DropSens (España), utilizando un potenciostato modelo μ AUTOLAB Type II de Metrohm (Suiza).

3.1.2 Reactivos.

Para la síntesis de las nanopartículas de paladio:

- Cloruro de paladio (PdCl_2) 99%. Sigma-Aldrich (España).
- Ácido clorhídrico 37% de VWR (Estados Unidos de América).
- Etanol (EtOH) de Merck Millipore (España).
- Polivinilpirrolidona (PVP), 40000 wt. Sigma-Aldrich (España).

Para la caracterización de las nanopartículas de paladio:

- Estándar de ICP de Pd de Merck (España).
- Estándar de ICP de Re de Merck (España).
- Ácido Nítrico 65% de Merck (España)
- Ácido clorhídrico 36% de Honeywell Fluka (Alemania)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0.01 M, pH 7.4, preparada a partir de unas pastillas de Sigma-Aldrich (España).

3.2 Métodos.

3.2.1 Síntesis de nanopartículas de paladio.

La síntesis de las nanopartículas de paladio (PdNPs) estudiadas en este trabajo, se realizó en el laboratorio del catedrático Francisco Javier García Alonso, del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

La síntesis se lleva a cabo siguiendo el procedimiento optimizado por Martínez-Esteban.⁴¹ La reacción de síntesis (Ecuación 2), se basa en la reducción de una especie de Pd (II) a Pd (0) empleando el etanol (EtOH) como agente reductor y el surfactante polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizador de las nanopartículas.



Para llevar a cabo esta reacción, se obtiene primero el H_2PdCl_4 empelando para ello 7.08 mg de PdCl_2 , 0.4 mL de HCl 0.2 M y 19.6 mL de agua destilada, que se mezclan y agitan a temperatura ambiente. La disolución de H_2PdCl_4 obtenida se adiciona sobre un matraz que contiene una disolución de PVP, H_2O y EtOH preparada previamente, empleando 88.92 mg PVP (40000 wt), 28 mL H_2O y 18.8 mL EtOH. Se introduce entonces el matraz en un baño de silicona a 100°C , bajo refrigeración, agitación magnética y en atmósfera inerte durante 3 horas. Al alcanzar la temperatura de reflujo, se observó un cambio de color en la disolución de amarillo (disolución de PdCl_2) a marrón muy oscuro (PdNPs-PVP). Posteriormente, se elimina el disolvente en rotavapor durante 4 horas y se resuspenden las nanopartículas en agua. La concentración de las nanopartículas sintetizadas y resuspendidas es 3mM.

3.2.2 Caracterización de nanopartículas de paladio.

Se emplearon diferentes técnicas para llevar a cabo la caracterización de las PdNPs, tanto para su estudio morfológico, como para conocer su composición, así como su efecto catalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR).

- Microscopía electrónica de transición (TEM).

Para el análisis por TEM, las nanopartículas de Pd sintetizadas se diluyen a una concentración 0.3 mM.

Las micrografías obtenidas de las PdNPs permiten observar su dispersión en agua, así como estimar su tamaño. Dicha estimación se llevó a cabo mediante el empleo del software ImageJ.

- [Dispersión de luz dinámica \(DLS\).](#)

El índice de polidispersidad (PDI) de las PdNPs sintetizadas, se determinó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés), empleando para ello el equipo Zetasizer Nano ZS. Las medidas se llevaron a cabo por duplicado, a temperatura ambiente ($22 \pm 0.1^\circ\text{C}$) en agua ultrapura.

- [Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo \(ICP-MS\).](#)

La cuantificación del paladio presente en las NPs sintetizadas permite conocer el porcentaje de recuperación y, portanto, el rendimiento de la reacción. Dicha cuantificación fue realizada en el laboratorio del catedrático José Manuel Costa Fernández, del departamento de Química Analítica de la Universidad de Oviedo.

Se realizó el análisis de una muestra en estado líquido de las PdNPs sintetizadas, empleando para ello un ICP-MS de triple cuadrupolo 8900 ICP-QQQ. El modo de medida empleado fue el MS/MS, analizando la masa 105 de Paladio, así como la masa 185 de Re, empleado como patrón interno para minimizar los posibles efectos de matriz.

La preparación de la muestra y de los calibrados se llevó a cabo empleando dos alícuotas de la muestra, a las que se ha añadido una concentración conocida de patrón interno. A continuación, se digieren en agua regia en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos, para eliminar la capa superficial de las partículas que pudiera interferir en la medida. Posteriormente, se diluyen en ácido nítrico para su introducción en el ICP-MS/MS. Para llevar a cabo la cuantificación del Pd en las NPs, se prepararon calibrados desde 0.5 hasta 20 ppb de Pd en ácido nítrico 2%, a los que se añadió 10 ppb de Re como patrón interno. Los patrones utilizados para los calibrados eran de grado ICP de 1000 mg/L para los 2 elementos, es decir de elevada pureza.

3.2.3 [Análisis electroquímico de las nanopartículas de paladio.](#)

- [Evaluación del efecto electrocatalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno, mediante voltamperometría cíclica.](#)

Para la caracterización electrocatalítica inicial de las PdNPs se llevó a cabo el análisis de éstas, a distintas concentraciones, mediante voltamperometría cíclica (CV). Para ello se depositan sobre el electrodo de trabajo 10 μL de las disoluciones de las nanopartículas

sintetizas, adicionando posteriormente 40 μL de la disolución de PBS, 0.01 M y pH 7.42 y dejando adsorber hasta sequedad. A continuación, se barre en el intervalo de potenciales entre -1.6V y 0V, a una velocidad de 100 mV/s.

- **Cuantificación mediante cronoamperometría.**

Para los estudios cuantitativos, se realizaron medidas por cronoamperometría (CA). Para ello, se depositan sobre el electrodo de trabajo 10 μL de las disoluciones de las nanopartículas sintetizadas, adicionando posteriormente 40 μL de la disolución de PBS 0.01M y pH 7.42 y dejando adsorber hasta sequedad. A continuación, se aplica un potencial fijo, durante un tiempo determinado (ver optimización). El valor medido de la corriente a este tiempo optimizado representa la señal analítica.

3.3 Resultados y discusión.

3.3.1 Caracterización de las nanopartículas de paladio.

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de alta resolución (HR-TEM) al medir una muestra de PdNPs 0.3 mM en agua, demostraron que la síntesis de las PdNPs fue exitosa, observándose una dispersión homogénea de nanopartículas esféricas (Figura 5A). El histograma de distribución de tamaño correspondiente (Figura 5B) dio un diámetro promedio de las PdNPs de 3.3 ± 0.7 nm.

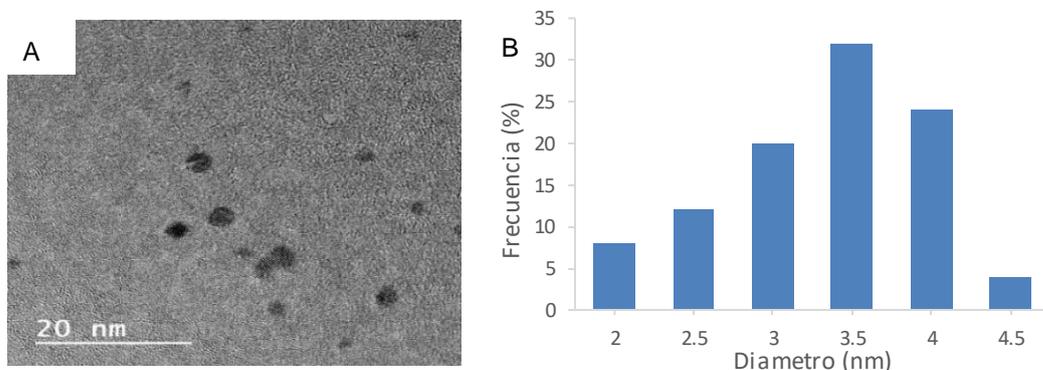


Figura 5. A) Micrografía de las PdNPs obtenido con el HR-TEM. B) Histograma de la distribución de tamaño del diámetro (en nm) de las PdNPs.

Mediante DLS se obtiene el índice de polidispersidad (PDi) de las PdNPs, que resulta ser de 0.455. En teoría, los valores de PDi varían de 0 (para una muestra perfectamente uniforme con respecto al tamaño de la partícula) a 1 (para una muestra altamente polidispersa con poblaciones de nanopartículas de diversos tamaños). Se considera que los valores de PDi superiores a 0.7, como es nuestro caso, indican que la muestra tiene una distribución de tamaño baja.^{42, 43}

Como se describe en el apartado de métodos, la cuantificación del contenido en Pd de las nanopartículas se llevó a cabo empleando la técnica de ICP-MS, obteniendo una concentración de 305 ± 5 ppm de Pd en la muestra medida, aproximadamente 2.87 mM de Pd. Suponiendo que la concentración teórica de Pd en las nanopartículas es de 3.02 mM, el % de recuperación y por tanto el rendimiento de la reacción es 94.81%. Siendo el rendimiento teórico de la reacción del 100% y el rendimiento real de la reacción siempre inferior al rendimiento teórico, un rendimiento real del 94.81% se considera muy bueno.

3.3.2 Actividad electrocatalítica de las nanopartículas de paladio sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR).

La actividad electrocatalítica de las PdNPs sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR), se evaluó en primer lugar por voltamperometría cíclica (CV), utilizando electrodos serigrafados de carbono (SPCE). Se obtuvieron diferentes voltamperogramas cíclicos, en PBS 0.01M, pH 7.4, barriendo en el intervalo de potenciales entre -0.10 V -1.60 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Los voltamperogramas obtenidos, para diferentes concentraciones de PdNPs, se muestran en la figura 6. En todos los casos, se observa un primer proceso a aproximadamente -0.60V, que corresponde a la ORR, y un segundo proceso aproximadamente a -1.2V, que corresponde a la evolución del hidrógeno.

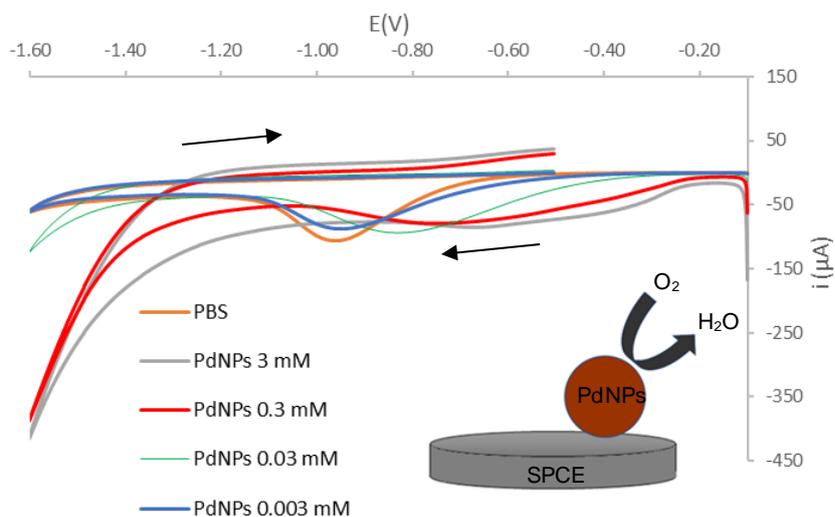


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos registrados, barriendo entre -0.10 V y -1.60 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s para PBS 0.01 M, pH 7.4 (curva naranja), y para diferentes concentraciones de las PdNPs en dicho medio: 3mM (curva gris), 0.3 mM (curva roja), 0.03 mM (curva verde) y 0.003 mM (curva azul).

La curva correspondiente al fondo (PBS, color naranja) muestra que la reducción del oxígeno del medio comienza a aproximadamente -0.70 V llegando a la intensidad máxima aproximadamente a los -0.95 V. En presencia de PdNPs en la superficie del electrodo, el proceso de reducción del oxígeno se desplaza hacia potenciales menos negativos, debido a su efecto catalítico sobre esta reacción. Dicho cambio resulta más notable cuanto mayor es la concentración de PdNPs. El voltamperograma cíclico obtenido al medir la disolución de mayor concentración de PdNPs (de color gris), muestra que en presencia de las PdNPs el proceso de reducción del oxígeno comienza aproximadamente a -0.30 V, alcanzando el máximo a aproximadamente -0.55 V. Además, el valor de corriente máximo (en valor absoluto) asociada al proceso aumenta con la concentración de PdNPs.

3.3.3 Cuantificación de nanopartículas de paladio mediante cronoamperometría.

Los resultados obtenidos mediante la caracterización voltamperométrica sugieren que, aplicando un potencial fijo, aproximadamente en el intervalo entre -0.40 V y -0.55 V, es posible discriminar entre diferentes concentraciones de PdNPs. Esto permite proponer un método analítico de cuantificación de PdNPs basado en medidas cronoamperométricas.

En este contexto, se evaluó el efecto del potencial de reducción aplicado, sobre la corriente de reducción asociada a la ORR, medida en modo cronoamperométrico. El tiempo de aplicación del potencial y medida de corriente fue de 50 segundos.

Se evaluaron potenciales de reducción de -0.55 V, -0.50 V, -0.45 V y -0.40 V, tanto para el fondo (PBS 0.01 M, pH 7.4) como para una suspensión de PdNPs de concentración 3 mM (Figura 7).

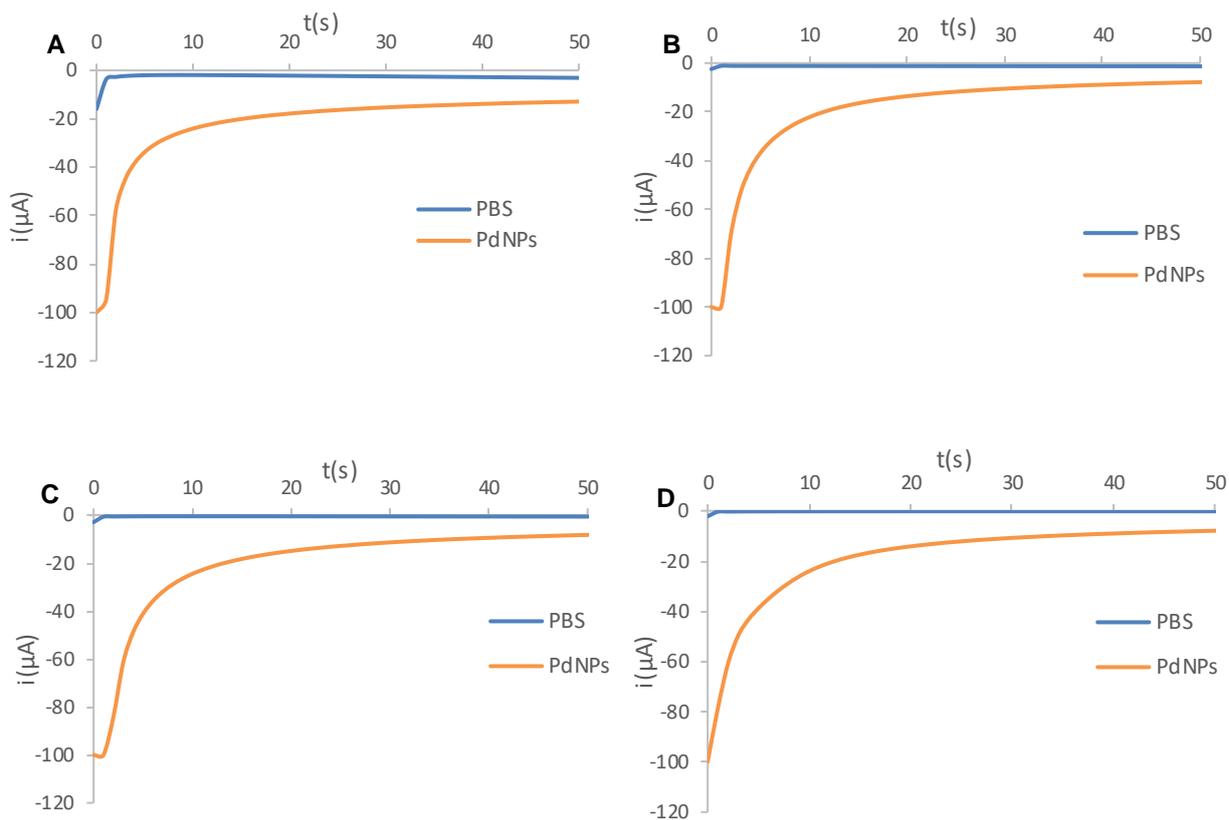


Figura 7. Cronoamperogramas obtenidos para el fondo (PBS 0.01 M, pH 7.4) (línea azul) y para una suspensión de PdNPs 3 mM en dicho medio (línea naranja), aplicando potenciales de -0.55V (A), -0.50V (B), -0.45 V (C) y -0.40 V (D).

Se observa en todos los casos una discriminación entre el valor de corriente obtenido en presencia y ausencia de PdNPs, debido a su efecto catalítico sobre la ORR. Esta discriminación es más evidente a tiempos cortos, inferiores a 50 segundos.

Por ello, se evaluó el efecto del potencial aplicado y se su tiempo de aplicación (en el intervalo 5-50 segundos), tanto para la suspensión de PdNPs de 3 mM como para el fondo (PBS 0.01 M, pH 7.4). Todas las medidas se realizaron por triplicado. El estudio se muestra en la figura 8.

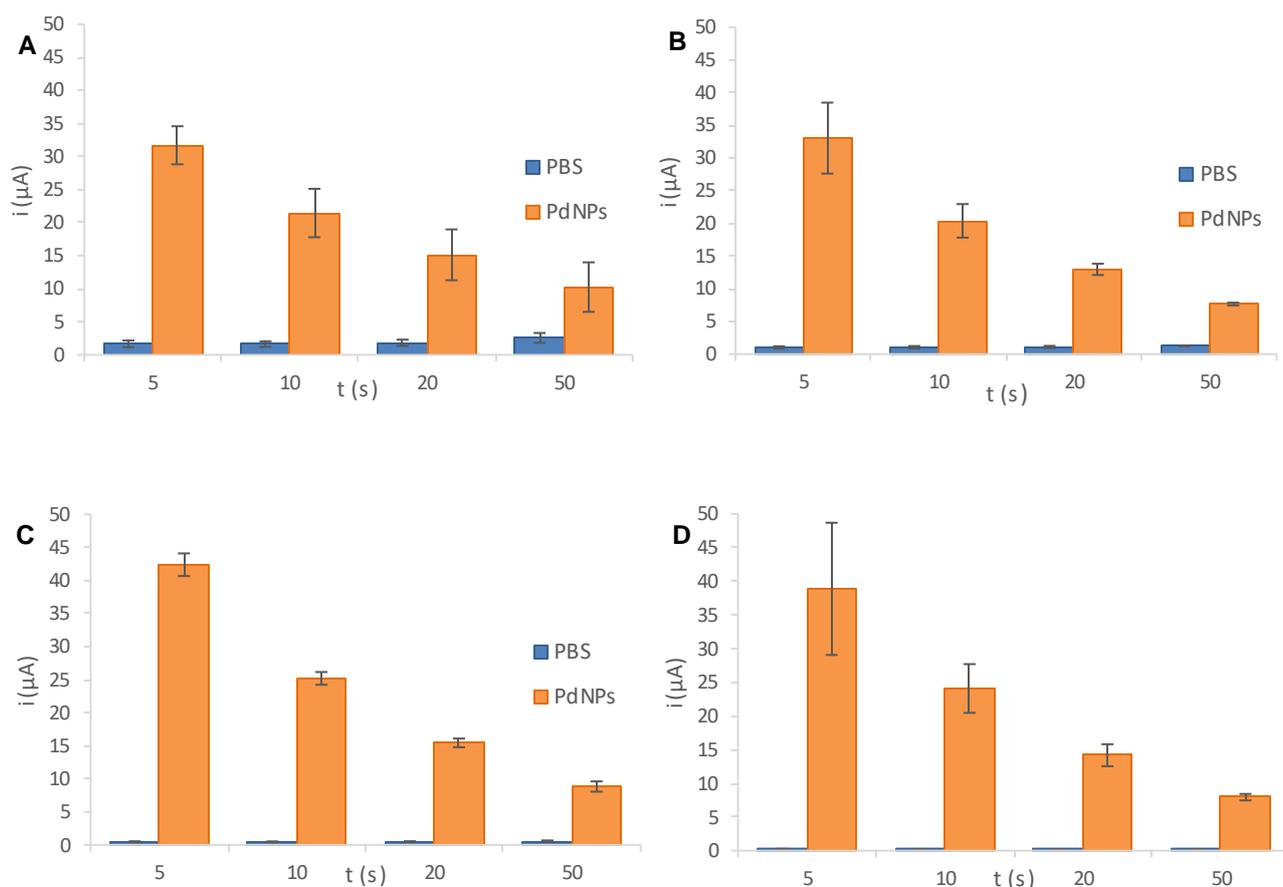


Figura 8. Efecto del potencial de reducción y su tiempo de aplicación sobre la corriente asociada al proceso de reducción del oxígeno, aplicando potenciales de -0.55V (A), -0.50V (B), -0.45 V (C) y -0.40 V (D), para el fondo (PBS 0.01 M, pH 7.4; azul) y para una suspensión de PdNPs 3 mM en dicho medio (naranja).

Observando los valores obtenidos, así como su desviación (barras de error), se escoge como potencial de reducción óptimo -0.45 V. En cuanto al tiempo de aplicación, para un tiempo de 5 segundos se obtiene una discriminación máxima entre el valor de la señal analítica en ausencia y en presencia de PdNPs. Por ello, se escoge este tiempo como óptimo para los estudios cuantitativos.

Una vez optimizados el potencial y el tiempo a los que se lleva a cabo la medida, se evaluaron diferentes concentraciones de PdNPs. Los resultados obtenidos, muestran que la intensidad de la corriente registrada (en valor absoluto) aumenta a medida que se incrementa la concentración de PdNPs, en el intervalo entre 1×10^{-4} mM y 5×10^{-3} mM, como se observa en la figura 9.

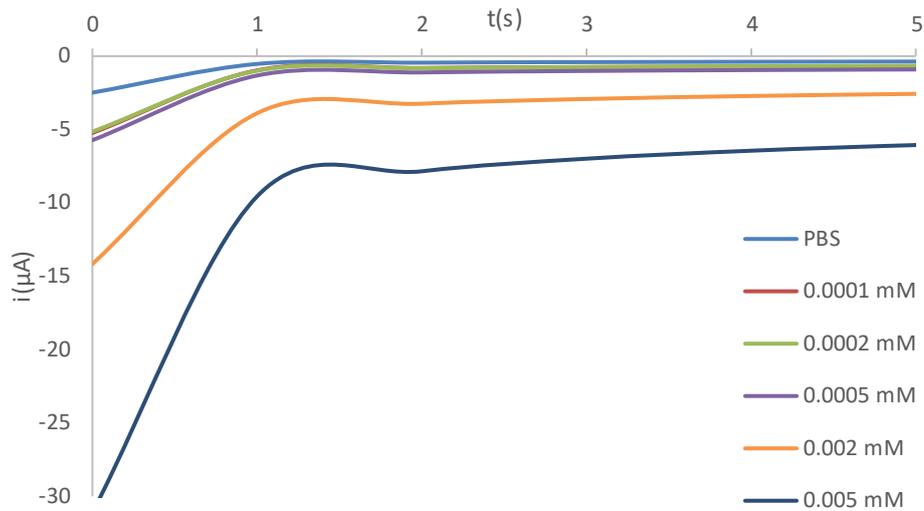


Figura 9. Cronoamperogramas obtenidos aplicando un potencial de -0.45 V para el fondo (PBS 0.01 M , $\text{pH } 7.4$) (línea azul) y para suspensiones de PdNPs de concentraciones $1 \times 10^{-4}\text{ mM}$ (línea roja), $2 \times 10^{-4}\text{ mM}$ (línea verde claro), $5 \times 10^{-4}\text{ mM}$ (línea morada), $2 \times 10^{-3}\text{ mM}$ (línea naranja) y $5 \times 10^{-3}\text{ mM}$ (línea verde oscuro) en dicho medio.

Finalmente, se evaluó el efecto de la concentración de PdNPs sobre la señal analítica (valor absoluto de la corriente registrada a 5 segundos). Como se observa en la figura 10, se obtuvo una relación lineal entre ambos parámetros, en el intervalo de concentraciones de PdNPs comprendido entre $1 \times 10^{-4}\text{ mM}$ y $5 \times 10^{-3}\text{ mM}$.

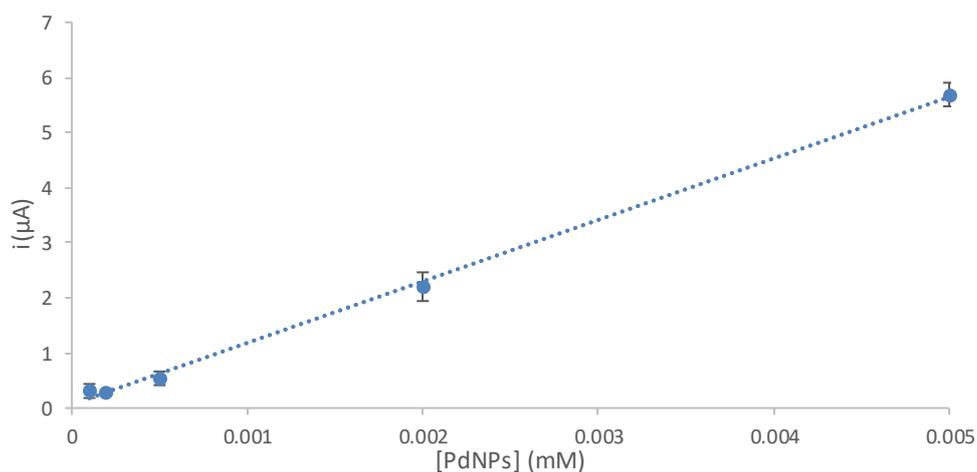


Figura 10. Efecto de la concentración de PdNPs, en el intervalo $1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}\text{ mM}$, sobre la señal analítica.

Esta relación lineal se ajusta a la siguiente ecuación:

$$i(\mu\text{A}) = 1116 [\text{PdNPs}] (\text{mM}) + 0.067$$

Se obtiene un buen coeficiente de correlación ($r = 0.9992$), con una desviación estándar relativa (RSD) promedio del 16%. De esta ecuación se puede estimar un límite de detección (LOD, calculado multiplicando tres veces la desviación estándar del blanco entre la pendiente de la recta) de $3 \times 10^{-5} \text{mM}$. Estos niveles de detección están en línea con los alcanzados para otras NPs usando metodologías alternativas, lo que demuestra la buena sensibilidad del método y su potencial aplicación para la detección de PdNPs usadas como marca en inmunosensores.

4. Conclusiones y perspectivas de futuro.

De los resultados obtenidos en este trabajo, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Se han sintetizado PdNPs de aproximadamente 3 nm de diámetro, con un elevado rendimiento de síntesis (94.81%).
- Las PdNPs sintetizadas tienen una buena polidispersidad y dan lugar a suspensiones estables en agua.
- Las caracterizaciones llevadas a cabo por voltamperometría cíclica a pH neutro demuestran que las PdNPs ejercen un efecto catalítico sobre la reacción de reducción del oxígeno (ORR), desplazando hacia potenciales menos negativos el potencial de reducción asociado a este proceso.
- Se ha desarrollado un método electroanalítico para la cuantificación de PdNPs a pH neutro, basado en medidas cronoamperométricas. Bajo las condiciones optimizadas (potencial de reducción de -0.45 V, aplicado durante 5 s), se consiguen detectar las PdNPs a niveles de 3×10^{-5} mM. Estos niveles de detección están en línea con los alcanzados para otras NPs usando metodologías alternativas, lo que demuestra la buena sensibilidad del método y su potencial aplicación para la detección de PdNPs usadas como marca en inmunosensores.
- El método de detección desarrollado permite la determinación de las PdNPs en el mismo medio en el que ocurren las reacciones inmunológicas (PBS 0.01 M, pH 7.4), sin la necesidad de medios ácidos/agresivos ni reactivos adicionales.

Los siguientes pasos en esta línea de trabajo consistirán en el estudio de estrategias de conjugación de las PdNPs con anticuerpos para su posterior uso como marcas en inmunosensores electroquímicos, aplicados a la detección de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer. Cabe reseñar que estas tareas estaban previstas en el marco del presente trabajo, pero no se pudieron llevar a cabo debido a la crisis sanitaria.

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, se prevé que la detección de las PdNPs en el mismo medio en el que ocurren las reacciones inmunológicas será de gran relevancia para el desarrollo futuro de sistemas biosensores altamente integrados.

5. Bibliografía

1. Ramírez, N. B., Salgado, A. M. and Valdman, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives. *Brazilian J. Chem. Eng.* **26**, 227–249 (2009).
2. Mahato, K., Chandra, P., Singh, R. and Kumar, S., Electrochemical Immunosensors Nanomaterials in Biosensors. *Handbook of Immunoassay Technologies*. 1.^a ed. Sandeep Vashist John Luong; 2018.
3. Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Bingqian, L., Wenqiang, L. and Tang, D. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta* **758**, 1–18 (2013).
4. Ybarra, G. ., Alvarez-Vallina. L., Gonzalez-Fernandez. A., Magadan-Mompó. S., Ramirez-Huerto. N., A Reche-Gallardo. P. and De los toyo-Gonzalez. J. R., Inmunotecnología y sus aplicaciones. *Ediuno* **1**, 149-158 (2018).
5. Liu, B. L. and Saltman, M. A. Immunosensor Technology. *CE Updat. - Chem. II* **27**, 109–115 (1996).
6. Lim, S. A. and Ahmed, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. *RSC Adv.* **6**, 24995–25014 (2016).
7. Larez-Velásquez, C., Koteich-Khatib, S. and López-González, F., Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones. *Nanotecnología Fundam. y Apl.* 203–222 (2015).
8. Rincken, T. Immunosensors. Biosensors - Micro and Nanoscale applications. *IntechOpen*. 166-200 (2015). <http://dx.doi.org/10.5772/60524>
9. Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S. and Ozkan, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors* **9**, 1–19 (2019).
10. Iglesias-Mayor, A., Amor-Gutiérrez, O., Costa-García, A. and de la Escosura-Muñiz, A. Nanoparticles as emerging labels in electrochemical immunosensors. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
11. Zhang, Y. and Wei, Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. *JEAC* **781**, 401–409 (2016).
12. Liu, G. and Lin, Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta* **74**, 308–317 (2007).

13. Keane, P. A., Sadda, S. R. and Ruiz-Garcia, H. Advanced in Technologies. *Retina* **1**, 133-150 (2013).
14. Rincken, T. Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor. *Biosens. - Micro Nanoscale Appl. IntechOpen*. 348-373 (2015) doi:10.5772/61149.
15. Saldan, I., Semenyuk, Y., Marchuk, I. & Reshetnyak, O. Chemical synthesis and application of palladium nanoparticles. *J. Mater. Sci.* **50**, 2337–2354 (2015).
16. Dumas, A. & Couvreur, P. Palladium: A future key player in the nanomedical field? *Chem. Sci.* **6**, 2153–2157 (2015).
17. Phan, T. T. V., Huynh, T. C., Manivasagan, P., Mondal, S. and Oh, J. An up-to-date review on biomedical applications of palladium nanoparticles. *Nanomaterials* **10**, (2020).
18. Lin, J. Y., Xi, C., Li, Z., Feng, Y., Wu, D.Y., Liu, H., Dong, C.K., Yao, P. and Du, X.W. Lattice-strained palladium nanoparticles as active catalysts for the oxygen reduction reaction. *Chem. Commun.* **55**, 3121–3123 (2019).
19. Nie, Y., Li, L. and Wei, Z. Recent advancements in Pt and Pt-free catalysts for oxygen reduction reaction. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2168–2201 (2015).
20. Park, D., Ahmed, M. S. and Jeon, S. Covalent functionalization of graphene with 1,5-diaminonaphthalene and ultrasmall palladium nanoparticles for electrocatalytic oxygen reduction. *Int. J. Hydrogen Energy* **42**, 2061–2070 (2017).
21. Bhowmik, T., Kundu, M. K. and Barman, S. Highly active and durable Pd nanoparticles-porous graphitic carbon nitride composite for electrocatalytic oxygen reduction reaction. *Int. J. Hydrogen Energy* **41**, 14768–14777 (2016).
22. Xiao, W. Liuthevicene-Cordeiro, M., Gong, M., Hang, L., Wanj, J., Bian, C., Zhu, J., Xin, H., and Wang, D. Optimizing the ORR activity of Pd based nanocatalysts by tuning their strain and particle size. *J. Mater. Chem. A* **5**, 9867–9872 (2017).
23. Korolev, I. O. Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Med. Student Res. J.* **4**, 24–33 (2014).
24. Bhushan, I., Kour, M., Kour, G., Gupta, S., Sharma, S. and Yadav, A. Alzheimer's disease: Causes & treatment – A review. *Annals of Biotechnology* **1**, (2018).
25. Fontán, L. La Enfermedad de Alzheimer: elementos para el diagnóstico y manejo clínico en el consultorio. *Biomedicina* **7**, 34–43 (2012).

26. García, E. and Rodríguez, C. Últimos Avances En El Diagnóstico Molecular Y Por Imagen De La Enfermedad De Alzheimer. *Informe de vigilancia tecnológica* **18**, (2010).
27. López Guijo, C., Jurado Villarreal, A. and Guisado Lozano, A. Biomarcadores de estado cognitivo en personas mayores. Revisión bibliográfica. *NURE Investig. Rev. Científica enfermería* **14**, 3 (2017).
28. Renzo Lanfranco, G., Manríquez-Navarro, P., Leyla Avello, G. and Canales-Johnson, A. Early evaluation of Alzheimer's disease: Biomarkers and neuropsychological tests. *Rev. Med. Chil.* **140**, 1191–1200 (2012).
29. Ferrer, G. A. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Kranion* **14**, 37–44 (2019).
30. Martínez-Rivera, M., Menéndez-González, M., Calatayud, M. T. and Pérez-Piñera, P. Biomarkers for Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Arch. Med.* **4**, 1-6 (2008).
31. Altuna-Azkargorta, M. and Mendioroz-Iriarte, M. Biomarcadores sanguíneos en la enfermedad de Alzheimer. *Neurología.* (2018).
32. Vieta, E. and Gastó, C. Transtornos bipolares. *Springer Science & Business Media* 214.-215 (1997).
33. Martín-Carrasco, M. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica. *Psicogeriatría* **1**, 101–114 (2009).
34. Gupta, J., Fatima, M., Islam, Z., Khan, R.H., Uversky, V.N. and Salahuddin, P. Nanoparticle formulations in the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. *Int. J. Biol. Macromol.* **130**, 515–526 (2019).
35. Rivas, L., de la Escosura-Muñiz, A., Pons, J. and Merkoçi, A. Alzheimer Disease Biomarker Detection Through Electrocatalytic Water Oxidation Induced by Iridium Oxide Nanoparticles. *Electroanalysis* **26**, 1287–1294 (2014).
36. Medina-Sánchez, M., Miserere, S., Morales-Narváez, E. and Merkoçi, A. On-chip magneto-immunoassay for Alzheimer's biomarker electrochemical detection by using quantum dots as labels. *Biosens. Bioelectron.* **54**, 279–284 (2014).
37. de la Escosura-Muñiz, A., Plichta, Z., Horák, D. and Merkoçi, A. Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **67**,

- 162–169 (2015).
38. Yu, Y., Sun, X., Tang, D., Changlin, L., Zhang, L., Dongxia, N., Xiaoxing, Y. and Guoyue, S. Gelsolin bound β -amyloid peptides(1-40/1-42): ELECTROCHEMICAL evaluation of levels of soluble peptide associated with Alzheimer's disease. *Biosens. Bioelectron.* **68**, 115–121 (2015).
 39. Han, J., Zhang, M., Chen, G., Zhang, Y., Wei, Q., Zhuo, Y., Xie, G., Yuan, R. and Chen, S. Ferrocene covalently confined in porous MOF as signal tag for highly sensitive electrochemical immunoassay of amyloid- β . *J. Mater. Chem. B* **5**, 8330–8336 (2017).
 40. Iglesias-Mayor, A., Amor-Gutiérrez, O., Novelli, A., Fernández-Sánchez, M.T., Costa-García, A. and de la Escosura-Muñiz, A. Bifunctional Au@Pt/Au core@shell nanoparticles as novel electrocatalytic tags in immunosensing: application for Alzheimer's disease biomarker detection. *Anal. Chem.* (2020) doi:10.1021/acs.analchem.0c00760.
 41. Martínez Esteban, V. A. Diseño de catalizadores basados en nanopartículas de Paladio para reacciones de interés sintético. Univ. Zaragoza 391 (2016).
 42. Folkerts, M. M. & Yablunovich, A. Dynamic light scattering. *Malvern*. 1–26 (2010).
 43. Sakho, E. H. M., Allahyari, E., Oluwafemi, O. S., Thomas, S. and Kalarikkal, N. Dynamic Light Scattering (DLS). *Therm. Rheol. Meas. Tech. Nanomater. Charact.* **3**, 37–49 (2017).