

The background is a vibrant collage. At the top left is a green Erlenmeyer flask with a yellow substance. To its right is a chemical structure of a branched alkene with a cyclic ether. Further right is a large orange sun. In the center, a white line graph with multiple peaks is superimposed over a purple circular area containing a blue and purple arrow. At the bottom left is a chemical structure of a purine-like base. At the bottom center is a beaker with blue liquid, a white electrode, and a black electrode. At the bottom right is a green Y-shaped antibody structure next to a stack of four yellow coins.

# **“DESARROLLO DE INMUNOSENSORES ELECTROQUIMIOLUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE MOLECÚLAS DE BAJO PESO MOLECULAR”**

**Roodney Alberto Carrillo Palomino**

**2026**

Secretaría de Posgrado y Cooperación Internacional  
Universidad Nacional de Río Cuarto

## **Anexo I (B)- DISPOSICIÓN SPyCI Nº 169/23** (24 abril de 2023)

### **Metadatos del/de la TF/TFI/TESIS**

- Título completo: Desarrollo de inmunosensores electroquimioluminiscentes para la detección de moléculas de bajo peso molecular.
- Autor/es: Carrillo Palomino, Roodney Alberto. Instituto para el Desarrollo Agroindustrial y la Salud (IDAS), UNRC-CONICET.
- Palabras clave: Inmunosensores / electroquimioluminiscencia / moléculas de bajo peso molecular / semiconductores / puntos cuánticos / micotoxinas.
- Resumen en español:

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se realizó la síntesis de puntos cuánticos de seleniuro de cadmio (CdSe) en solución acuosa estabilizados con una mezcla formada por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y ácido n-morfolino etanosulfónico (MES). Se investigó el cambio de los diversos parámetros de la síntesis como también de la relación MPA/MES. Los puntos cuánticos de CdSe se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades ópticas, electroquímicas y electroquimioluminiscentes, lo que permitió seleccionar aquellos con mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y alta emisión electroquimioluminiscente para ser utilizados, en una segunda instancia, para el desarrollo de sensores e inmunosensores electroquimioluminiscentes.

Adicionalmente, se sintetizaron heteroestructuras conjugadas formadas por puntos cuánticos de CdSe (MPA/MES CdSe) y g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>). Se realizó una caracterización fotofísica y electroquímica de las heteroestructuras conjugadas, en donde se determinó que la EQL de la heteroestructura conjugada responde a un mecanismo de transferencia electrónica, en donde el emisor luminiscente es el QD. La heteroestructura conjugada fue utilizada como sonda electroquimioluminiscente para la detección de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en matrices complejas, como suero humano liofilizado. El sensor resultó muy sensible, logrando un límite de detección de  $1,81 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , además de presentar un bajo efecto debido a interferentes.

En una última etapa, se desarrolló un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de la micotoxina esterigmatocistina (STE). Para alcanzar el objetivo propuesto, se modificaron electrodos de óxido de indio y estaño (ITO) con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, el que se utilizó como plataforma electroquimioluminiscente para la inmovilización de anticuerpos monoclonales anti STE (mAb-STE). La detección de STE se basó en un formato competitivo. El mismo necesitó de la conjugación de STE, por medio de un enlace covalente, con puntos cuánticos de CdSe, mediante el uso de L-lisina como espaciador. Se caracterizó el bioconjugado desarrollado por técnicas espectroscópicas y electroquímicas. La detección de STE en matrices complejas de extracto de granos de maíz se realizó a partir de la técnica EQL on-off, en donde la señal de EQL obedecen a un mecanismo de transferencia

electrónica entre el  $g-C_3N_4$  y los puntos cuánticos de CdSe. El inmunosensor presentó un límite de detección de  $9,77 \times 10^{-7} \text{ ng mL}^{-1}$ , equivalente a  $6,97 \times 10^{-6} \mu\text{g Kg}^{-1}$  de STE en maíz, y porcentajes de recuperación entre 86,5% y 99,3%. El rendimiento del inmunosensor desarrollado fue comparado con HPLC UV-vis, obteniendo una excelente correlación entre ambos métodos. En resumen, esta Tesis Doctoral abarca aspectos tanto fisicoquímicos como analíticos, a partir de la síntesis de nanoestructuras y desarrollo de sensores/inmunosensores electroquimioluminiscentes. Se abordaron estudios fisicoquímicos de las nanoestructuras sintetizadas con el fin de comprender su comportamiento fotofísico y electroquímico, y su aplicación al desarrollo de sensores/biosensores, abordando así aspectos de la química analítica moderna.

- Resumen en inglés:

In this Doctoral Thesis work, a study was carried out on the synthesis of CdSe quantum dots stabilized with a mixture formed by 3-mercaptopropionic acid (MPA) and n-morpholino ethanesulfonic acid (MES) at different molar ratios (MPA/MES) with the aim of stabilizing the nanocrystals in aqueous solutions. The quantum dots were characterized according to their optical, electrochemical and electrochemiluminescent properties, which allowed the selection of quantum dots with higher quantum yield and higher electrochemiluminescent emission to be used, in a second instance, for the development of electrochemiluminescent sensors and immunosensors.

Additionally, heterostructures formed by CdSe (MPA/MES CdSe) quantum dots and  $g-C_3N_4$  (MPA/MES CdSe@ $g-C_3N_4$ ) were synthesized. A photophysical and electrochemical characterization of the heterostructures was performed, where it was determined that the electrochemiluminescence of the heterostructure responds to a resonance energy transfer process, where the luminescent emitter is the quantum dot. The heterostructure was used as an electrochemiluminescent probe for the detection of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in human serum matrices. The sensor was found to be very sensitive, with a detection limit of  $1.81 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , as well as selective.

In a final step, indium tin oxide electrodes (ITOs) were modified with  $g-C_3N_4$ , which was used as an electrochemiluminescent platform for immobilization of monoclonal antibodies (mAb-STE) for the development of an electrochemiluminescent immunosensor to detect the mycotoxin Sterigmatocystin (STE). The detection of STE was based on a competitive format, through the bioconjugation of STE covalently bound to CdSe quantum dots using L-lysine as a spacer. The developed bioconjugate was characterized by spectroscopic and electrochemical techniques. The detection of STE in complex matrices of corn extract was performed using the on-off electrochemiluminescence technique. The immunosensor presented a detection limit of  $9.77 \times 10^{-7} \text{ ng mL}^{-1}$ , equivalent to  $6.97 \times 10^{-6} \mu\text{g Kg}^{-1}$  of STE in corn, and recovery percentages between 86.5% and 99.3%. The performance of the immunosensor developed was compared with HPLC UV-Vis, obtaining an excellent correlation between both methods. In summary, this Doctoral Thesis covers both physicochemical and analytical aspects, from the synthesis of nanostructures and development of electrochemiluminescent

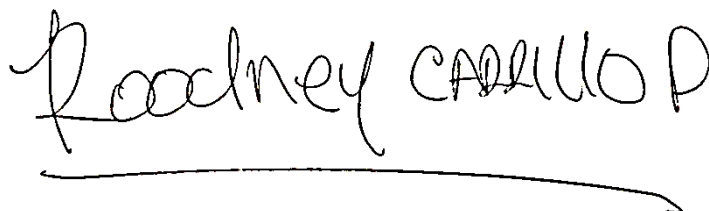
sensors/immunosensors, based on photophysical and electrochemical studies. Studies of the synthesized nanostructures were addressed to understand their photophysical and electrochemical behavior. The synthesized nanostructures were used in the development of sensors/immunosensors, thus addressing aspects of modern analytical chemistry.

- Evaluado por pares: SI
- Fecha: (25/02/2026)
- Formato: PDF
- Idioma: Español
- Financiamiento: UNRC, CONICET, MINCyT, ANPCyT, FONCyT.
- Condiciones de uso: CC BY-NC-SA

A modo de recordatorio y según consta en Régimen de Carreras de Posgrado se transcribe la leyenda que debe aparecer **OBLIGATORIAMENTE** en el/la TF/TFI/Tesis:

"Informo que, de acuerdo a lo que prescribe la **Ley N° 26.899**<sup>(\*)</sup> (2013), su Reglamento Operativo (Resolución 753-E/2016) y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución del Consejo Superior N° 202/2021), **este documento es resultado del financiamiento total o parcial otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto**".

(\*) La Ley N° 26.899 define por financiamiento total o parcial con fondos públicos, a la inversión que el Estado realiza ya sea de forma directa, (como el pago de salarios, incentivos, subsidios, etc.), o indirecta (el acceso a bibliografía científica adquirida con fondos públicos, la utilización de la infraestructura de las instituciones y organismos, el uso de insumos y equipamientos, el financiamiento total o parcial de viajes, etc.) para el desarrollo de la actividad científica, tecnológica y de innovación.



Firma y aclaración del autor del TF/TFI/Tesis



**“DESARROLLO DE INMUNOSENSORES  
ELECTROQUIMIOLUMINISCENTES PARA LA  
DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE BAJO PESO  
MOLECULAR”**

**Roodney Alberto Carrillo Palomino**

**2026**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales**

**Departamento de Química**



**Tesis Doctoral en Ciencias Químicas**

## **“DESARROLLO DE INMUNOSENSORES ELECTROQUIMIOLUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE BAJO PESO MOLECULAR”**

**Ing. Qco. Carrillo Palomino, Roodney Alberto**

**Director: Dr. Arévalo, Fernando Javier**

**Codirectora: Dra. Porcal, Gabriela Valeria**

**Rio Cuarto, Córdoba Argentina**

**2025**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

*Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas Y Naturales*

*Departamento de Química*

Ing. Qco. Carrillo Palomino, Roodney Alberto

Firma..... Aclaración .....

Dr. Arévalo, Fernando Javier

Firma..... Aclaración .....

Dra. Porcal, Gabriela Valeria

Firma..... Aclaración .....

## COMISIÓN ASESORA Y JURADO

***Dr. Bertolino, Franco Adrián***      Departamento de Química, Facultad de Química,  
Bioquímica y Farmacia,  
  
Universidad Nacional de San Luis

Firma ..... Aclaración .....

***Dr. Fungo, Fernando Gabriel***      Departamento de Química, Facultad de Ciencias  
Exactas, Físico - Químicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma ..... Aclaración .....

***Dr. Arbeloa, Ernesto***  
***Maximiliano***      Departamento de Química, Facultad de Ciencias  
Exactas, Físico - Químicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma ..... Aclaración .....

Lugar y fecha .....

Calificación .....



# **PREFACIO**

*“Todos nuestros sueños se pueden cumplir, con dedicación y con mucho esfuerzo nosotros podemos alcanzar lo que queremos, sin importar los obstáculos que se nos presenten”*

*Keysi Sayago*

## ***Agradecimientos***

*Es una dicha para mí, a mis 32 años de vida alcanzar esta meta, un sueño que hoy se vuelve una realidad, un camino que recorrí con la ayuda de Dios y de muchos seres queridos que estuvieron siempre junto a mí, dándome su apoyo hasta llegar a mi meta.*

*Mami, María del Carmen Palomino Claro, sin palabras parta expresarte todo lo que te debo en esta vida y mil más. Padre, Jorge Luis Carrillo Meléndez, gracias por darme el incentivo desde aquel 2010 donde inicie mi vida universitaria. Mis hermanas, Yelis y Natalie, mis sobrinos, simplemente gracias por darme muchísimo apoyo y hacerme sentir especial.*

*Primo, Juan Carlos Carrillo Orozco, a veces me pregunto que hubiese sido de mi vida sin tu apoyo para lograr mis metas, tu ejemplo y el creer en mí hicieron que hoy día sea una persona decidida y el profesional que soy, infinitamente gracias por todo.*

*A mis amigos de la vida, Jairo García, Camilo Rodríguez, Brayan Villa, Marcos Rodríguez, Steven Ortiz, Eduardo Manotas y Daniela Dangond, muchísimas gracias porque siempre fueron esos amigos que creyeron en mí, que estuvieron siempre en tristezas y alegrías, celebraron mis triunfos, fueron mi apoyo en momentos difíciles; esto es poco para lo que ustedes merecen y representan en mi vida.*

*A mis queridos colegas ingenieros químicos de nuestra alma mater, Universidad del Atlántico, amigos y hermanos de la vida, Grace Ariza, Yurany Saucedo, Eileen Bolívar, Hugo Cerra, Daniel Ríos, Maybel De Los Reyes, Viviana Peña, Adela Robles, Kelwis Pérez y Dayana Hernández muchísimas gracias por crecer junto a mí, son y serán siempre parte de mi vida; por siempre ingenieros químicos.*

*A mis hermanos Alexander Sánchez, Alberto Ramos y Jerson Paz, con quienes inicié esta nueva etapa de mi vida en este hermoso país, Argentina, gracias, amigos y hermanos míos, porque por muy difícil que fue siempre me ayudaron a salir adelante y contra todo pronóstico aquí estamos, que orgulloso me siento de ustedes y que bendición contar con ustedes.*

*Micaela Tessa, gracias, amiga mía, siempre fuiste un apoyo incondicional para mí en mi estadía en Rio Cuarto, personas como tu necesita este mundo, gracias por todo lo que has hecho por mí.*

*A mis hermosas cubanas, Laura Torres, Claudia Chávez y Elizabeth Bermúdez, gracias, chicas, haberlas conocido en mi formación doctoral fue muy grato, me siento feliz de tenerlas en mi vida hasta el día que no esté más, son unos seres maravillosos. Claudia gracias por todo, eres la persona más bella que he conocido.*

*José Cabas, Alberto Varela, Jhair León, Luis Pedroza, Leandro Fuentes y Luis Escobar, somos la representación de la costa colombiana, orgulloso de ustedes y de su apoyo hacia mí, gracias, chicos por su cooperación.*

*María Navas, Ingrid Rincón, Nahir Panozzo, Micaela Grassano, Agostina Biondi, Milena Boarini y Florencia Carrizo, muchísimas gracias, son muy especiales en mi vida y gracias por darme siempre alientos y palabras de fortaleza que me ayudaron a llegar a donde estoy.*

*Sebastián López, Héctor Rueda y Damián Pedraza, amigos míos gracias porque siempre me brindaron su amistad para hacer mi camino más alegre y les agradezco toda su ayuda.*

*Agustina Reynoso, gracias por recibirme amablemente mi primer día de doctorado y siempre brindarme ese hermoso apoyo y cariño hasta el día de hoy.*

*Aylen Di Toco, gracias electrohermana por tus enseñanzas y por ser esa persona especial que siempre has sido, palabras de agradecimiento y cariño hacia ti.*

*A mis demás compañeros del doctorado gracias por todas las cosas hermosas y su ayuda intangible para este hermoso logro que me llena de orgullo.*

*A mis directores Fernando Arévalo y Gabriela Porcal, muchísimas gracias por todo su tiempo y por orientarme, brindarme lo mejor de ustedes para ser el doctor que soy hoy día, mis padres científicos, los llevo siempre en mi corazón. A mi grupo GEANA y a mis fotoquímicos, gracias por sus aportes y por su ayuda, me hicieron sentir uno más de su familia científica.*

*Universidad Nacional de Río Cuarto, Gracias por abrirme las puertas y permitirme formarme en este valioso científico que soy; aquel 2021 ingrese con muchas expectativas y anhelos, hoy puedo decir que los cumplí y lo logré, gracias por permitirme ser parte de esta valiosa Institución. CONICET, gracias por otorgarme la oportunidad de ser un Doctor en Ciencias Químicas. Gracias a todos los que cooperaron para que esto fuese posible.*

*Mi amada Colombia, no sabes cuánto te amo y estoy orgulloso de ser colombiano, gracias, Dios por haberme permitido nacer en esas tierras, ser un ejemplo de lo que somos los colombianos, me siento feliz de ser el embajador de mi bello país. Argentina, tierra de amores y felicidad, gracias por acogerme como un argentino más, me siento más argentino que el mismo obelisco.*

*Aún recuerdo cuando ayer entre como un Ingeniero Químico, decidido, entregado y optimista a este largo y duro camino, y hoy salgo por la puerta grande con muchísimos más valores y muy orgulloso de ser Doctor en Ciencias Químicas.*

*Puedo decir con mucho orgullo y emoción, que hoy culmino una bella etapa en mi vida, llena de enseñanzas y valiosos recuerdos, los mismos que quedaran para toda la vida.*

*Lo que ayer no fue, hoy lo es, y mañana es para siempre*

*Gracias...*



**CONTENIDO PRELIMINAR**

# TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                                                                    | 13        |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                                  | 15        |
| Abreviaturas.....                                                                                        | 24        |
| Resumen .....                                                                                            | 27        |
| Summary.....                                                                                             | 29        |
| <b>1. Preámbulo .....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| <b>2. Antecedentes y estado del arte.....</b>                                                            | <b>36</b> |
| <b>3. Justificación.....</b>                                                                             | <b>39</b> |
| <b>4. Hipótesis y objetivos .....</b>                                                                    | <b>40</b> |
| 4.1. Hipótesis .....                                                                                     | 40        |
| 4.2. Objetivos generales.....                                                                            | 40        |
| 4.3. Objetivos específicos .....                                                                         | 41        |
| <b>5. Nanomateriales semiconductores.....</b>                                                            | <b>43</b> |
| 5.1. Clasificación de los nanomateriales semiconductores.....                                            | 45        |
| 5.1.1. Nanomaterial semiconductor intrínseco .....                                                       | 45        |
| 5.1.2. Nanomaterial semiconductor extrínseco .....                                                       | 46        |
| <b>6. Puntos cuánticos semiconductores .....</b>                                                         | <b>47</b> |
| 6.1. Propiedades electrónicas y ópticas de puntos cuánticos semiconductores.....                         | 49        |
| 6.2. Síntesis de puntos cuánticos semiconductores .....                                                  | 53        |
| 6.3. Aplicaciones de los puntos cuánticos semiconductores .....                                          | 55        |
| <b>7. Nitruro de carbono grafitico (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) .....</b>                              | <b>56</b> |
| 7.1. Síntesis de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....                                                   | 58        |
| 7.2. Funcionalidades superficiales del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....                             | 60        |
| <b>8. Procesos de emisión de luminiscencia: principios y fundamentos .....</b>                           | <b>62</b> |
| 8.1. Generación de los estados excitados de nanopartículas: transiciones radiativas y no radiativas..... | 64        |
| 8.2. Procesos de desactivación de la luminiscencia.....                                                  | 67        |
| 8.3. Transferencia de energía.....                                                                       | 70        |
| 8.4. Procesos electroquímicos en nanopartículas semiconductoras .....                                    | 72        |
| <b>9. Generación de la electroquimioluminiscencia .....</b>                                              | <b>74</b> |
| 9.1. Cinética de la electroquimioluminiscencia.....                                                      | 75        |
| 9.2. Cuantificación de la señal electroquimioluminiscente .....                                          | 76        |
| 9.3. Coreactantes.....                                                                                   | 79        |
| <b>10. Biosensores .....</b>                                                                             | <b>80</b> |
| 10.1. Diseño y ensamble de biosensores .....                                                             | 83        |
| 10.1.1. Materiales para el electrodo o el sustrato de soporte del biosensor....                          | 83        |
| 10.2. Anticuerpos.....                                                                                   | 85        |

|            |                                                                                              |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 10.2.1.    | Interacciones Antígeno - Anticuerpo.....                                                     | 88         |
| 10.2.2.    | Inmovilización de anticuerpos sobre superficies electródicas.....                            | 90         |
| 10.3.      | Inmunoensayos .....                                                                          | 92         |
| <b>11.</b> | <b>Bioconjugación de antígenos y anticuerpos con nanopartículas.....</b>                     | <b>95</b>  |
| 11.1.      | Bioconjugación con puntos cuánticos .....                                                    | 95         |
| 11.1.1.    | Funcionalización superficial de los puntos cuánticos.....                                    | 96         |
| 11.1.2.    | Estrategias de bioconjugación .....                                                          | 99         |
| 11.2.      | Cuantificación de la respuesta de detección en inmunosensores .....                          | 101        |
| 11.2.1.    | Modelo lineal.....                                                                           | 101        |
| 11.2.2.    | Modelo cuadrático .....                                                                      | 102        |
| 11.2.3.    | Modelo logístico .....                                                                       | 102        |
| 11.2.4.    | Modelo exponencial .....                                                                     | 104        |
| 11.3.      | Determinación de los parámetros estadísticos en inmunoensayos .....                          | 105        |
| <b>12.</b> | <b>Reactivos.....</b>                                                                        | <b>109</b> |
| <b>13.</b> | <b>Electrodos.....</b>                                                                       | <b>111</b> |
| <b>14.</b> | <b>Potenciostatos.....</b>                                                                   | <b>112</b> |
| <b>15.</b> | <b>Equipos de medición óptica .....</b>                                                      | <b>114</b> |
| 15.1.      | Medición de electroquimioluminiscencia anódica .....                                         | 115        |
| 15.1.1.    | Celda de electroquimioluminiscencia.....                                                     | 117        |
| 15.2.      | Equipos para la caracterización y morfología de los materiales .....                         | 118        |
| 15.3.      | Cromatografía líquida de alta resolución.....                                                | 118        |
| 15.3.1.    | Columnas de extracción de fase solida.....                                                   | 119        |
| <b>16.</b> | <b>Técnicas y procedimientos .....</b>                                                       | <b>120</b> |
| 16.1.      | Espectroscopia UV-visible .....                                                              | 121        |
| 16.2.      | Espectroscopia de fluorescencia.....                                                         | 121        |
| 16.3.      | Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo.....                                   | 122        |
| 16.4.      | Emisión de luminiscencia electrogenerada.....                                                | 123        |
| 16.4.1.    | Electroquimioluminiscencia en función del potencial.....                                     | 124        |
| 16.4.2.    | Electroquimioluminiscencia en función del tiempo .....                                       | 124        |
| 16.5.      | Síntesis de puntos cuánticos CdSe .....                                                      | 127        |
| 16.5.1.    | Purificación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe.....                                       | 129        |
| 16.6.      | Síntesis de nitrato de carbono grafitico .....                                               | 131        |
| 16.6.1.    | Exfoliación de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....                                         | 132        |
| 16.7.      | Síntesis de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ..... | 134        |
| 16.8.      | Bioconjugación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe con esterigmatocistina .....             | 136        |
| 16.8.1.    | Síntesis de esterigmatocistina hemiacetal.....                                               | 136        |
| 16.8.2.    | Conjugación de STE-OH con puntos cuánticos MPA/MES CdSe ..                                   | 138        |
| 16.9.      | Preparación de solución tampón de Tris – HCl.....                                            | 142        |
| 16.10.     | Preparación de la solución tampón de fosfato .....                                           | 143        |
| 16.11.     | Preparación de la solución tampón de borato .....                                            | 143        |
| 16.12.     | Preparación de las soluciones de peróxido de hidrogeno .....                                 | 144        |
| 16.13.     | Extracción de la matriz de maíz .....                                                        | 145        |

|            |                                                                                                                                                                                       |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 16.13.1.   | Preparación de las soluciones de extracto de maíz contaminadas con STE                                                                                                                | 146        |
| 16.13.2.   | Preparación de las soluciones para las mediciones HPLC                                                                                                                                | 147        |
| 16.14.     | Limpieza y activación de los electrodos ITOs                                                                                                                                          | 148        |
| <b>17.</b> | <b>Caracterización de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe</b>                                                                                                                           | <b>150</b> |
| 17.1.      | Caracterización óptica de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe                                                                                                                           | 150        |
| 17.2.      | Caracterización morfológica y estructural de los puntos cuánticos CdSe                                                                                                                | 160        |
| 17.3.      | Caracterización electroquímica y electroquimioluminiscente de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe                                                                                       | 163        |
| <b>18.</b> | <b>Caracterización de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub></b>                                                                                  | <b>174</b> |
| 18.1.      | Determinación de la concentración de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en la síntesis de las heteroestructuras conjugadas con MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>              | 176        |
| 18.2.      | Caracterización morfológica de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                                                          | 180        |
| 18.3.      | Caracterización electroquímica de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                                                       | 183        |
| 18.4.      | Análisis electroquimioluminiscente de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                                                   | 186        |
| 18.5.      | Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la intensidad de fluorescencia y electroquimioluminiscencia de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 189        |
| 18.6.      | Rendimiento analítico electroquimioluminiscente de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                                         | 193        |
| 18.7.      | Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en muestras de suero                                                                                                                  | 196        |
| 18.8.      | Selectividad y repetibilidad de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en la detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                           | 199        |
| 18.9.      | Comparación del rendimiento de la sonda electroquimioluminiscente con otros sensores para la detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                               | 202        |
| <b>19.</b> | <b>Desarrollo de un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de STE</b>                                                                                               | <b>203</b> |
| 19.1.      | Caracterización UV-Vis de la esterigmatocistina                                                                                                                                       | 203        |
| 19.2.      | Caracterización del bioconjugado CdSe@STE                                                                                                                                             | 204        |
| 19.2.1.    | Caracterización de la STE-OH                                                                                                                                                          | 205        |
| 19.2.2.    | Caracterización óptica del bioconjugado CdSe@STE                                                                                                                                      | 208        |
| 19.3.      | Construcción del inmunosensor electroquimioluminiscente                                                                                                                               | 209        |
| 19.3.1.    | Caracterización electroquímica de la superficie del inmunosensor                                                                                                                      | 210        |
| 19.3.2.    | Orientación de la cara conductora modificada del ITO hacia el detector de emisión                                                                                                     | 215        |
| 19.3.3.    | Determinación de la concentración óptima de bioconjugado CdSe@STE                                                                                                                     | 217        |
| 19.3.4.    | Concentración óptima de mAb-STE                                                                                                                                                       | 220        |
| 19.3.5.    | Bloqueo de los sitios de uniones no específicas con BSA                                                                                                                               | 221        |
| 19.4.      | Análisis de la anisotropía de fluorescencia del inmunosensor                                                                                                                          | 222        |
| 19.5.      | Mecanismo de electroquimioluminiscencia del inmunosensor desarrollado                                                                                                                 | 225        |

|            |                                                                      |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------|------------|
| 19.6.      | Detección de STE en solución patrón .....                            | 227        |
| 19.7.      | Detección de STE en matriz de maíz.....                              | 228        |
| 19.7.2.    | Detección de STE en muestras reales de maíz .....                    | 233        |
| 19.7.3.    | Comparación del inmunosensor electroquimioluminiscente mediante HPLC | 235        |
| 19.7.4.    | Reactividad cruzada del inmunosensor electroquimioluminiscente.      | 238        |
| <b>20.</b> | <b>Conclusiones.....</b>                                             | <b>242</b> |
| <b>21.</b> | <b>Referencias bibliográficas.....</b>                               | <b>247</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Estructuras comunes del nitruro de carbono a partir de su síntesis. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 57  |
| <b>Tabla 2.</b> Coreactantes típicos utilizados para la EQL de nanopartículas y sus correspondientes reacciones. ....                                                                                                                                                                                                             | 80  |
| <b>Tabla 3.</b> Tipos de materiales comunes en el diseño y ensamble de biosensores. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 84  |
| <b>Tabla 4.</b> Volúmenes de solución MPA, MES y NaOH utilizados en la preparación de cada síntesis de nanocristales de CdSe. ....                                                                                                                                                                                                | 128 |
| <b>Tabla 5.</b> Valores experimentales del diámetro, coeficiente de extinción y banda prohibida energética, determinados a partir de los gráficos de absorción, para QD CdSe en función de la relación molar MPA/MES. ....                                                                                                        | 154 |
| <b>Tabla 6.</b> Longitud de onda máxima de emisión, energía mínima del estado singlete, FWHM y rendimiento cuántico de fluorescencia obtenidos a partir de los espectros de emisión de intensidad de fluorescencia para los QD CdSe sintetizados. ....                                                                            | 157 |
| <b>Tabla 7.</b> Tiempos de vida de fluorescencia de los QD de CdSe sintetizados con distintas relaciones molares de MPA/MES.....                                                                                                                                                                                                  | 158 |
| <b>Tabla 8.</b> $\Delta E_p$ obtenidos a diferentes valores de pH para las síntesis de QD CdSe a distintas relaciones molares MPA/MES. ....                                                                                                                                                                                       | 165 |
| <b>Tabla 9.</b> Tiempos de vida de fluorescencia para g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> , y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....                                                                                                                                                     | 183 |
| <b>Tabla 10.</b> $E_g$ determinado por espectroscopía UV-visible y $\Delta E_p$ determinado por voltamperometría cíclica para g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . ....                                                                              | 185 |
| <b>Tabla 11.</b> Cifras de mérito obtenidas para las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en la detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en solución Tris-HCl. ....                                                                                                                        | 196 |
| <b>Tabla 12.</b> Desviación estándar relativa promedio (RSD %) obtenida a partir del promedio de la intensidad de EQL para distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , utilizando una matriz compuesta por 5 $\mu$ L de suero liofilizado reconstituido diluido en 2500 $\mu$ L de solución tampón Tris-HCl..... | 201 |
| <b>Tabla 13.</b> Diferentes métodos propuestos en la literatura para cuantificar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....                                                                                                                                                                                                             | 202 |
| <b>Tabla 14.</b> Áreas promedias electroactivas para 10 electrodos ITOs nuevos, modificados con 100 $\mu$ L de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> y reutilizados. Los valores promedio son el resultado de 10 electrodos con mediciones triplicadas. ....                                                                            | 212 |

|                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 15.</b> Valores de longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) y anisotropía de fluorescencia ( $r_0$ ) del bioconjugado CdSe@STE en solución y unido al mAb-STE en el inmunosensor.    | 225 |
| <b>Tabla 16.</b> Comparación de los límites de detección de STE reportados en estudios previos para distintas matrices, utilizando diferentes técnicas de detección analítica. ....                 | 232 |
| <b>Tabla 17.</b> Resultados experimentales de la detección de STE en muestras maíz mediante la curva de calibración construida, comparados con las concentraciones de STE en matrices de maíz. .... | 235 |
| <b>Tabla 18.</b> Preparación de las soluciones para medición por HPLC de las matrices de maíz M <sub>1</sub> y M <sub>2</sub> contaminadas con una solución patrón de STE 12,2 µg/mL. ....          | 236 |
| <b>Tabla 19.</b> Concentración de STE determinada mediante HPLC y el inmunosensor electroquimioluminiscente.....                                                                                    | 238 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Representación de las bandas de energía en materiales conductores, semiconductores y aislantes.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 44 |
| <b>Figura 2.</b> Clasificación de los nanomateriales semiconductores (A) intrínsecos y (B) extrínsecos del tipo N (arriba) y del tipo P (abajo).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 47 |
| <b>Figura 3.</b> Transición intrabanda directa e indirecta para un punto cuántico semiconductor (arriba); emisión de luminiscencia directa e indirecta (abajo). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Figura 4.</b> Efectos de las trampas superficiales en la emisión de fluorescencia de puntos cuánticos (A). Orbitales colgantes terminales en punto cuántico semiconductor, en este caso punto cuántico de CdSe (B).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 52 |
| <b>Figura 5.</b> Métodos de síntesis y obtención de puntos cuánticos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 54 |
| <b>Figura 6.</b> Aplicaciones de los puntos cuánticos en las nuevas tecnologías. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 56 |
| <b>Figura 7.</b> Síntesis de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a partir de distintos precursores ricos en N y C. Cada precursor permite la formación de las nanolaminas bajo rangos de temperaturas específicas en el proceso de calcinación.....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 59 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> con sus posibles alternativas de interacción con el medio. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 61 |
| <b>Figura 9.</b> Mecanismos de generación de luminiscencia: quimioluminiscencia (a); fotoluminiscencia (b) y; electroquimioluminiscencia (c). A y D hacen referencia al aceptor y dador de electrones, respectivamente. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 64 |
| <b>Figura 10.</b> Diagrama de Jablonsky para un nanomaterial semiconductor y sus posibles procesos radiativos y no radiativos mediante perturbación fotónica y excitación redox. Las líneas onduladas y discontinuas representan las transiciones no radiativas y pérdidas energéticas; las líneas continuas representan los procesos involucrados en las transiciones radiativas. Se indican los procesos que ocurre en el núcleo y la superficie, además de los procesos electroquímicos en la interfaz electrodo - solución. .... | 65 |
| <b>Figura 11.</b> Mecanismo transferencia de energía tipo Förster (FRET) entre dos nanomateriales luminiscentes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 71 |
| <b>Figura 12.</b> Mecanismos de generación de la EQL vía de aniquilación (A); vía coreactante (B) reductivo - oxidativo (arriba) y oxidativo - reductivo (abajo). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 74 |
| <b>Figura 13.</b> Medición de la EQL mediante la cronoamperometría de salto múltiple. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 77 |
| <b>Figura 14.</b> EQL en función de los potenciales de oxidación del coreactante y el luminóforo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 78 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 15.</b> Esquema de las técnicas para la funcionalización de materiales carbonosos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 85  |
| <b>Figura 16.</b> Representación esquemática de las cinco clases de inmunoglobulinas en mamíferos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 86  |
| <b>Figura 17.</b> Estructura de un anticuerpo IgG y sus grupos funcionales en las regiones Fc y Fab.                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 88  |
| <b>Figura 18.</b> Mecanismos de interacción y/o unión Ab – Ag.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 89  |
| <b>Figura 19.</b> Inmunoensayo de formato tipo sándwich. El antígeno queda capturado sobre un anticuerpo inmovilizado sobre la superficie del electrodo y un anticuerpo marcado con una enzima.                                                                                                                                                                                                        | 93  |
| <b>Figura 20.</b> Inmunosensor basado en el principio de funcionamiento de un inmunoensayo competitivo. Los antígenos compiten por los sitios de uniones disponibles de los anticuerpos.                                                                                                                                                                                                               | 94  |
| <b>Figura 21.</b> Alternativas para la modificación de la superficie de QDs. Intercambio de ligando con (A) grupos mercaptoammonio o mercaptocarboxílico; (B) derivados de grupos ditiolanos (ácido lipoico); (C) glutatión; (D) péptidos modificados con cisteína; (E) encapsulación de QD hidrofóbicos mediante autoensamblaje con cationes, aniones o polímeros anfifílicos (TOPO); (F) poliaminas. | 99  |
| <b>Figura 22.</b> Estrategias de conjugado de nanopartículas – biomoléculas: (A) interacción electrostática, (B) enlace directo del aminoácido en el núcleo de la nanopartícula, (C) unión covalente al ligando de la nanopartícula, (D) unión de un cofactor proteico a la nanopartícula (interacciones secundarias).                                                                                 | 100 |
| <b>Figura 23.</b> Gráfico logístico típico de 4 parámetros para un inmunoensayo en formato competitivo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 103 |
| <b>Figura 24.</b> Rangos dinámicos totales y lineales en las curvas de calibración estándar obtenidas comúnmente en inmunosensores.                                                                                                                                                                                                                                                                    | 107 |
| <b>Figura 25.</b> Electrodo ITOs, contra electrodo de platino (CE: Pt) y electrodos de referencia comerciales de Ag/AgCl en NaCl 3M (Arriba); electrodos impresos de carbono (EIC) comerciales de la marca PalmSens utilizados en los estudios EQL catódicos (Abajo).                                                                                                                                  | 111 |
| <b>Figura 26.</b> Potenciostato/galvanostato PalmSens 4.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 113 |
| <b>Figura 27.</b> Equipo bipotenciostato/galvanostato uStat ECL de DropSens con todos sus accesorios (izquierda); componentes de la celda de medición EQL (derecha).                                                                                                                                                                                                                                   | 113 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 28.</b> Equipos utilizados en los estudios de caracterización óptica: espectrofluorómetro (izquierda) y espectrofotómetro (derecha). .....                                                                                                                                                                          | 114 |
| <b>Figura 29.</b> Equipo de conteo de fotones individuales (SPC) con sus accesorios. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 115 |
| <b>Figura 30.</b> Dispositivo de acoplamiento espectrofluorómetro - potencióstato diseñado para las lecturas de electroquimioluminiscencia anódica (izquierda); configuración porta celda y detector de la emisión luminiscente electrogenerada (derecha). .....                                                              | 116 |
| <b>Figura 31.</b> Celda electroquímica utilizada para los experimentos de electroquimioluminiscencia anódica. ....                                                                                                                                                                                                            | 117 |
| <b>Figura 32.</b> Cromatógrafo Waters Alliance e2695 Separation Module (izquierda); columna Phenomenex Luna 00G-4252-E0 (derecha). ....                                                                                                                                                                                       | 119 |
| <b>Figura 33.</b> Columna polimérica de fase reversa Strata-X utilizadas para la detección de STE en muestras de maíz. ....                                                                                                                                                                                                   | 120 |
| <b>Figura 34.</b> Diagrama esquemático de una curva típica de decaimiento de intensidad de fluorescencia: la gráfica representa el recuento estadístico de los tiempos de fotones individuales para construir curvas de tiempo de vida de fluorescencia. Inserto: Principio del registro del tiempo de la tarjeta TCSPC. .... | 123 |
| <b>Figura 35.</b> Transientes de corriente (-) y EQL (--) para un sistema controlado por difusión. Respuesta típica para una medición EQL mediante la excitación electroquímica por cronoamperometría. ....                                                                                                                   | 126 |
| <b>Figura 36.</b> Metodología experimental para la síntesis de QD MPA/MES CdSe (derecha); estructura química de los QDs sintetizados mediante esta técnica (izquierda). ....                                                                                                                                                  | 127 |
| <b>Figura 37.</b> síntesis obtenidas de QD CdSe a diferentes relaciones molares de MPA/MES. Las flechas indican la proporción molar de los estabilizantes MES (verde) y MPA (naranja). ....                                                                                                                                   | 129 |
| <b>Figura 38.</b> Diagrama del proceso de purificación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe mediante precipitación, utilizando etanol. ....                                                                                                                                                                                   | 130 |
| <b>Figura 39.</b> Mecanismo químico para la formación de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a partir de urea (arriba) y proceso de formación de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (abajo). ....                                                                                                                                    | 131 |
| <b>Figura 40.</b> Proceso de exfoliación mediante tratamiento químico y purificación del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . ....                                                                                                                                                                                               | 133 |
| <b>Figura 41.</b> Montaje experimental para la exfoliación del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . ....                                                                                                                                                                                                                         | 134 |
| <b>Figura 42.</b> Síntesis y estructura química de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . ....                                                                                                                                                                                          | 135 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 43.</b> Comparación visual de las síntesis de QD MPA/MES CdSe y las heteroestructuras conjugadas CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a relaciones molares de MPA/MES 30/70 (izquierda), 50/50 (centro) y 100/0 (derecha).....                              | 135 |
| <b>Figura 44.</b> Esquema de la síntesis de formación de STE-OH a partir de STE.....                                                                                                                                                                                  | 137 |
| <b>Figura 45.</b> Mecanismo de formación de STE-OH a partir de STE en medio ácido. ....                                                                                                                                                                               | 138 |
| <b>Figura 46.</b> Esquema del proceso de conjugación de CdSe@L-lys.....                                                                                                                                                                                               | 139 |
| <b>Figura 47.</b> Mecanismo de reacción para la obtención de CdSe@L-lys.....                                                                                                                                                                                          | 140 |
| <b>Figura 48.</b> Mecanismo de reacción para la formación del bioconjugado CdSe@STE.<br>.....                                                                                                                                                                         | 141 |
| <b>Figura 49.</b> Esquema de la síntesis de bioconjugación de CdSe@STE.....                                                                                                                                                                                           | 142 |
| <b>Figura 50.</b> Preparación de las soluciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para su determinación por electroquimioluminiscencia.....                                                                                                                            | 144 |
| <b>Figura 51.</b> Procedimiento experimental para la obtención y purificación del extracto de maíz utilizado para la detección de STE por el inmunosensor y por HPLC. ....                                                                                            | 145 |
| <b>Figura 52.</b> Preparación de las muestras de maíz contaminadas exprofeso con STE para los estudios de detección con el inmunosensor electroquimioluminiscente.....                                                                                                | 147 |
| <b>Figura 53.</b> Espectros de absorción medidos en solución acuosa para los QD CdSe sintetizados a relaciones molares de estabilizadores MPA/MES de: 30/70 (—); 50/50 (—); 100/0 (—); 150/0 (—). ....                                                                | 151 |
| <b>Figura 54.</b> Gráficos de Tauc para los QD CdSe sintetizados con relaciones molares MPA/MES de: 30/70 (—) y 100/0 (—). Determinación de los valores aproximados de E <sub>g</sub> de acuerdo con el criterio de extrapolación. ....                               | 152 |
| <b>Figura 55.</b> Espectros de emisión de intensidad de fluorescencia corregidas por absorbancia para los QD CdSe MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—) respectivamente. $\lambda_{exc} = 450$ nm.....                                                  | 155 |
| <b>Figura 56.</b> Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de los QD CdSe a relaciones molares MPA/MES de: 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—). ....                                                                                                     | 158 |
| <b>Figura 57.</b> Espectros de emisión de intensidad de fluorescencia registrados a 45 (—), 90 (—), 150 (—), 210 (—), 1320 (—) y 1440 (—) min de síntesis para los QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES de 50/50 (A) y 100/0 (B). $\lambda_{exc} = 450$ nm. .... | 159 |
| <b>Figura 58.</b> Espectros FT-IR de los puntos cuánticos de CdSe con relaciones molares MPA/MES de 50/50 (—) y de 100/0 (—), así como también para los estabilizantes puros MPA (—) y MES (—). ....                                                                  | 161 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 59.</b> Imágenes TEM para los puntos cuánticos de CdSe sintetizados a relaciones molares MPA/MES 30/70 (A) y 100/0 (B), respectivamente. A la derecha se muestra la distribución poblacional por tamaño de los puntos cuánticos CdSe. ....                                                                                                                                                                        | 162 |
| <b>Figura 60.</b> Voltamperogramas cíclicos de puntos cuánticos de CdSe MPA/MES 30/70 registrados en una solución tampón de fosfatos, pH 5,8. La flecha indica la dirección de barrido de potencial. $v$ : 0,05 V/s. ....                                                                                                                                                                                                   | 164 |
| <b>Figura 61.</b> Voltamperogramas cíclicos de EQL vs. E (arriba), y $i$ vs. E (abajo) para QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—), medidos en solución tampón fosfato, pH 7,5 en presencia de S2O8 <sup>2-</sup> 0,1 M, a una velocidad de barrido de 0,5 V s <sup>-1</sup> . Las flechas rojas indican el barrido de potencial. ..                                         | 168 |
| <b>Figura 62.</b> Voltamperogramas cíclicos de EQL vs. E para QD de CdSe absorbidos en EIC, con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—) y 100/0 (—), en presencia de S2O8 <sup>2-</sup> 0,1 M medidos a una velocidad de barrido de 0,5 V/s. Las flechas rojas indican el barrido de potencial. ....                                                                                                                | 171 |
| <b>Figura 63.</b> Voltamperogramas cíclicos anódicos de EQL de los QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—) y 100/0 (—), medidos en solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, en presencia de TPrA 21 mM como coreactante a una velocidad de barrido de 0,5 V s <sup>-1</sup> . Las flechas rojas indican el barrido de potencial. ....                                                                        | 173 |
| <b>Figura 64.</b> Espectros de absorción e intensidad de fluorescencia normalizado para el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> exfoliado (línea roja) y sin exfoliar (línea negra). $\lambda_{exc}$ = 320 nm. ....                                                                                                                                                                                                              | 175 |
| <b>Figura 65.</b> Espectros de absorción (A) e intensidad de fluorescencia en solución acuosa corregidos por absorción (B) para el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—), MPA/MES CdSe (—) y MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—). $\lambda_{exc}$ = 320 nm. ....                                                                                                                                                 | 177 |
| <b>Figura 66.</b> Gráfico de absorción de los QD MPA/MES CdSe (—) y emisión de fluorescencia de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—). En sombreado la región de superposición espectral. ....                                                                                                                                                                                                                                | 178 |
| <b>Figura 67.</b> Espectros de intensidad de fluorescencia del QD MPA/MES CdSe (—) y de la heteroestructura MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> para concentraciones de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> de 0,025 (—), 0,05 (—), 0,1 (—) y 0,2 (—) mg/mL, excitados a 320 nm. Inserto: intensidad de fluorescencia del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—) y el punto cuántico CdSe. $\lambda_{exc}$ = 320 nm. .... | 179 |
| <b>Figura 68.</b> Espectros FT-IR para g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—), MPA/MES CdSe (—) y MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—). ....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 180 |
| <b>Figura 69.</b> Imágenes TEM para el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> exfoliado (A), y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (B) y (C). ....                                                                                                                                                                                                                                       | 181 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 70.</b> Voltamperogramas cíclicos para el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (A), 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (B), 50/50 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (C) y 100/0 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (D) en una solución de ACN + HTBA 0,1 M, en dirección de barrido anódico (—) y catódico (—). $v = 50$ mV/s.....                                                                | 184 |
| <b>Figura 71.</b> Espectros de EQL normalizados para g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—), QD MPA/MES CdSe (—), y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—), en tampón Tris – HCl, pH 7,4 y TPrA 0,1 M. $E_{\text{aplicado}} = 1,3$ V. ....                                                                                                                                                          | 186 |
| <b>Figura 72.</b> Diagrama de los niveles energéticos de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . Descripción de la posible transferencia electrónica en presencia de TPrA como mecanismo de electroquimioluminiscencia. Las líneas verdes corresponden a la BV (—), las líneas magenta a la BC (—), ● corresponde al electrón y ○ los huecos. ....                                                     | 188 |
| <b>Figura 73.</b> Espectros de intensidad de fluorescencia de MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en presencia de (—) 0 $\mu\text{M}$ , (—) 49,7 $\mu\text{M}$ , (—) 147 $\mu\text{M}$ , (—) 291 $\mu\text{M}$ , (—) 566 $\mu\text{M}$ , (—) 1030 $\mu\text{M}$ y (—) 1630 $\mu\text{M}$ de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Inserto: grafica $I_{\text{FL}}$ vs Log $\text{cH}_2\text{O}_2$ . $\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm..... | 189 |
| <b>Figura 74.</b> Voltamperogramas de EQL de una solución de 60 $\mu\text{L}$ de MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en ausencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (—) y para concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de: (—) 4 $\mu\text{M}$ , (—) 12,5 $\mu\text{M}$ , (—) 40 $\mu\text{M}$ y (—) 56 $\mu\text{M}$ . Inserto: grafica $I_{\text{EQL}}$ vs Log $\text{cH}_2\text{O}_2$ . $v = 50$ mV/s.....               | 191 |
| <b>Figura 75.</b> Respuesta de EQL en solución Tris-HCl y 25 mM TPrA para (—) MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : (—) $8,71 \times 10^{-10}$ M, (—) $8,71 \times 10^{-9}$ M, (—) $8,71 \times 10^{-8}$ M, (—) $8,71 \times 10^{-7}$ M y (—) $8,71 \times 10^{-6}$ M. ....                                                                                           | 193 |
| <b>Figura 76.</b> Curvas de calibración para la determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de las heteroestructuras conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas. ....                                                                                                                                                                                          | 194 |
| <b>Figura 77.</b> Curvas de calibración para la determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de las heteroestructuras conjugada 50/50 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas. ....                                                                                                                                                                                          | 195 |
| <b>Figura 78.</b> Curvas de calibración para la determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de las heteroestructuras conjugada 100/0 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas. ....                                                                                                                                                                                          | 195 |
| <b>Figura 79.</b> Intensidad de EQL para la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en presencia de diferentes volúmenes agregados de suero liofilizado reconstituido en una solución Tris-HCl pH 7,4, + TPrA 0,21 M. ....                                                                                                                                                                            | 197 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 80.</b> Curva de calibración de EQL para la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en presencia de 5 µL de suero liofilizado a distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Inserto: transitorios de electroquimioluminiscencia para agregados de 5 µL de suero liofilizado con concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de (—) $5,20 \times 10^{-7}$ M, (—) $1,30 \times 10^{-6}$ M, (—) $2,60 \times 10^{-6}$ M, (—) $5,20 \times 10^{-5}$ M, (—) $5,20 \times 10^{-4}$ M, (—) $5,20 \times 10^{-3}$ M, y (—) $5,20 \times 10^{-2}$ M en solución tampón Tris – HCl + 25 mM TPrA, siendo $E_{\text{off}} = -0,2$ V y $E_{\text{on}} = 1,3$ V. Cada punto representa el promedio de 10 medidas replicadas. .... | 198 |
| <b>Figura 81.</b> Intensidad de EQL medida en suero liofilizado reconstituido con $1 \times 10^{-6}$ M de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y diferentes agregados de ácido ascórbico. La barra de error representa el promedio de tres medidas replicadas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 200 |
| <b>Figura 82.</b> Espectro de absorción de la STE en ACN. Inserto: estructura química de la STE. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 204 |
| <b>Figura 83.</b> Espectros de absorbancia (izquierda) y emisión de fluorescencia corregida por absorbancia (derecha) para STE (—) y STE-OH (—) en solución de etanol. $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 205 |
| <b>Figura 84.</b> Espectros RMN <sup>1</sup> H en cloroformo deuterado para la STE (—) y STE-OH (—) visto desde el intervalo 0 ppm - 2,3 ppm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 206 |
| <b>Figura 85.</b> Espectros RMN <sup>1</sup> H en cloroformo deuterado para la STE (—) y STE-OH (—) visto desde el intervalo 3.5 ppm - 4 ppm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 207 |
| <b>Figura 86.</b> Espectros de absorción (izquierda) y emisión de fluorescencia (derecha) para QD 30/70 MPA/MES CdSe (—), STE-OH (—) y el bioconjugado CdSe@STE (—) en solución tampón borato pH 8,8. $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 209 |
| <b>Figura 87.</b> Diseño del inmunosensor de EQL para la detección de STE utilizando mAb-STE inmovilizados en la superficie de un electrodo ITO previamente modificado con g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 210 |
| <b>Figura 88.</b> Voltamperogramas cíclicos de (Fe(CN) <sub>6</sub> ) <sup>3-</sup> /(Fe(CN) <sub>6</sub> ) <sup>4-</sup> 5 mM en 0,1 M de KCl usando electrodos ITOs sin modificar (A) y modificados con g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (B). $v = 50$ mV/s. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 211 |
| <b>Figura 89.</b> Voltamperogramas cíclicos de electrodo ITO desnudo (—), ITO/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (—), ITO/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /mAb-STE (—) y ITO/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /mAb-STE/BSA (—) en una solución de (Fe(CN) <sub>6</sub> ) <sup>3-</sup> /(Fe(CN) <sub>6</sub> ) <sup>4-</sup> 5 mM en 0,1 M de KCl. $v = 50$ mV/s. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 214 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 90.</b> EIS de la cupla $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}/(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$ 5 mM en 0,1 M de KCl para el electrodo ITO desnudo (—), ITO/g- $\text{C}_3\text{N}_4$ (—), ITO/g- $\text{C}_3\text{N}_4/\text{mAb-STE}$ (—) y ITO/g- $\text{C}_3\text{N}_4/\text{mAb-STE/BSA}$ (—).....                                                     | 214 |
| <b>Figura 91.</b> Orientación de la cara conductora del ITO modificado con g- $\text{C}_3\text{N}_4$ en relación con el detector de emisión del equipo. ....                                                                                                                                                                                                | 216 |
| <b>Figura 92.</b> Transitorios de EQL para g- $\text{C}_3\text{N}_4$ adsorbido sobre la superficie conductora del ITO con diferentes orientaciones en relación con el detector de emisión: frente su cara conductora al detector (A) y orientando su cara no conductora al detector (B).....                                                                | 217 |
| <b>Figura 93.</b> Inmunosensores EQL para la detección de STE a diferentes concentraciones de CdSe@STE bajo irradiación de luz UV-Vis. los círculos muestran las superficies de electrodos vistas desde un microscopio x100.....                                                                                                                            | 218 |
| <b>Figura 94.</b> Arriba: transitorios de EQL del inmunosensor a 0 (—), 25 ng/mL (—), 50 ng/mL (—), 100 ng/mL (—) y 200 ng/mL (—) de CdSe@STE en Tris-HCl, pH 7,4 usando TEA, aplicando saltos de potencial de -0,2 V a 1,3 V. Abajo: curva $I_{\text{EQL}}$ vs $c_{\text{CdSe@STE}}$ , para 10 $\mu\text{g/mL}$ de mAb-STE. ....                           | 219 |
| <b>Figura 95.</b> Curva $I_{\text{EQL}}/I_{\text{EQL}0}$ vs. Log $c_{\text{STE}}$ del análisis competitivo para el inmunosensor de electroquimioluminiscencia en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE para concentraciones de mAb-STE de 5 $\mu\text{g/mL}$ (curva negra), 10 $\mu\text{g/mL}$ (curva magenta) y 20 $\mu\text{g/mL}$ (curva naranja).....      | 220 |
| <b>Figura 96.</b> Curvas de calibración para el inmunosensor a diferentes concentraciones de STE en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE con agregado de BSA 0,01 mg/mL (—) y sin agregado de BSA (—). Inserto: descripción de las interacciones específicas y no específicas en el inmunosensor. La concentración de mAb-STE fue de 10 $\mu\text{g/mL}$ ..... | 222 |
| <b>Figura 97.</b> Espectros de excitación para el electrodo ITO desnudo (—), g- $\text{C}_3\text{N}_4$ absorbido en ITO (—), inmunosensor CdSe@STE/mAb-STE/g- $\text{C}_3\text{N}_4/\text{ITO}$ (—) y CdSe@STE libre (—) en PBS pH 7,5.....                                                                                                                 | 223 |
| <b>Figura 98.</b> Espectros de emisión de fluorescencia para ITO desnudo (—), g- $\text{C}_3\text{N}_4$ absorbido en ITO (—), inmunosensor CdSe@STE/mAb-STE/g- $\text{C}_3\text{N}_4/\text{ITO}$ (—) y CdSe@STE libre (—) en PBS pH 7,5. $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ . ....                                                                     | 224 |
| <b>Figura 99.</b> Curva de calibración para el inmunosensor electroquimioluminiscente. Concentración de CdSe@STE = 25 ng/mL, y concentración de mAb-STE = 10 $\mu\text{g/mL}$ . Inserto: rango dinámico lineal de la curva de calibración. Cada punto representa el promedio de diez medidas replicadas. ....                                               | 227 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 100.</b> Espectros de absorción para el extracto de maíz estéril (—), solución patrón de STE 1,02 mg/mL (—) y extracto de maíz contaminada con 1,05 mg/mL de STE (—).<br>.....                                                                                                                                                                                             | 229 |
| <b>Figura 101.</b> Curva de calibración usando el inmunosensor electroquimioluminiscente a diferentes concentraciones de STE en una matriz de maíz 0,14 g/mL, en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE. La concentración de mAb-STE fue de 10 µg/mL. Cada punto representa el promedio de diez medidas replicadas.....                                                                   | 230 |
| <b>Figura 102.</b> Rango dinámico lineal de la curva de calibración construida para el extracto de granos de maíz mostrada en la Figura 101, a distintas concentraciones de STE.....                                                                                                                                                                                                 | 231 |
| <b>Figura 103.</b> Curva de calibración para el inmunosensor electroquimioluminiscente incluyendo las respuestas obtenidas para las muestras M <sub>1</sub> y M <sub>2</sub> , en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE. La concentración de mAb-STE fue de 10 µg/mL. ....                                                                                                               | 234 |
| <b>Figura 104.</b> Cromatogramas de las muestras M <sub>1</sub> (A) y M <sub>2</sub> (B) en KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +ACN (7+5) para las concentraciones de las soluciones preparadas A (—), B (—), C (—), D (—) y E (—). ....                                                                                                                                                | 236 |
| <b>Figura 105.</b> Curva de las adiciones estándar de STE para M <sub>1</sub> (A) y M <sub>2</sub> (B) en solución de ACN+KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en proporción 5:7. ....                                                                                                                                                                                                    | 237 |
| <b>Figura 106.</b> Reactividad cruzada del inmunosensor electroquimioluminiscente frente a micotoxinas estructuralmente relacionadas. La c <sub>STE</sub> fue de 1×10 <sup>-3</sup> ng/mL, zearalanona, altenueno, altertoxina, cercosporina y una mezcla de estos (todos a 1×10 <sup>-1</sup> ng/mL). ZEA: zearalenona, ALT: altenueno, ATLX: altertoxina y CES: cercosporina. .... | 239 |
| <b>Figura 107.</b> Curvas de calibración para el análisis de la reactividad cruzada en el inmunosensor electroquimioluminiscente frente a micotoxinas estructuralmente relacionadas a esterigmatocistina. ZEA: zearalenona (•), ALT: altenueno (•), ATLX: altertoxina (•) y CES: cercosporina (•). ....                                                                              | 240 |

## Abreviaturas

|                                           |                                                                                           |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^{\text{suero}}$ | concentración de peróxido de hidrogeno en suero liofilizado                               |
| $c_{\text{STE}}^*$                        | concentración de esterigmatocistina en el seno de la solución                             |
| $e^-$                                     | electrón                                                                                  |
| $E_{p,a}$                                 | potencial de pico anódico                                                                 |
| $E_{p,c}$                                 | potencial de pico catódico                                                                |
| $h^+$                                     | hueco                                                                                     |
| $I_{\text{EQL}}$                          | intensidad de electroquimioluminiscencia                                                  |
| $I_{\text{EQL}}^{\text{Area}}$            | Intensidad de electroquimioluminiscencia del área bajo la curva                           |
| $I_{\text{fl}}$                           | intensidad de fluorescencia                                                               |
| $\Delta G$                                | variación de la energía libre de Gibbs                                                    |
| Ab                                        | anticuerpo                                                                                |
| Ag                                        | antígeno                                                                                  |
| BC                                        | banda de conducción                                                                       |
| BSA                                       | albumina sérica bovina                                                                    |
| BV                                        | banda de valencia                                                                         |
| CdSe                                      | punto cuántico de seleniuro de cadmio                                                     |
| CdSe@STE                                  | bioconjugado de puntos cuánticos de seleniuro de cadmio con esterigmatocistina hemiacetal |

|                                 |                                                                  |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| CE                              | contraelectrodo                                                  |
| CV                              | coeficiente de variación                                         |
| E                               | potencial                                                        |
| EDC                             | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida                     |
| $E_g$                           | brecha de banda energética o banda prohibida                     |
| EIC                             | electrodo impreso de carbono                                     |
| EQL                             | electroquimioluminiscencia o quimioluminiscencia electrogenerada |
| ER                              | electrodo de referencia                                          |
| FWHM                            | ancho completo a la mitad del máximo                             |
| g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | nitruro de carbono grafitico                                     |
| h                               | constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-34}$ J s)                |
| HPLC                            | cromatografía líquida de alto rendimiento                        |
| HTBA                            | hexafluorofosfato de tetrabutilamonio                            |
| <i>i</i>                        | corriente                                                        |
| ITO                             | electrodo de óxido de indio y estaño                             |
| LD                              | límite de detección                                              |
| L-lys                           | lisina clorhidrato                                               |
| LC                              | límite de cuantificación                                         |
| mAb-STE                         | anticuerpo monoclonal anti esterigmatocistina                    |
| MES                             | ácido n-morfolino etanosulfónico                                 |

|                                              |                                                                                                                       |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MPA                                          | ácido 3-mercaptopropionico                                                                                            |
| MPA/MES CdSe                                 | punto cuántico de seleniuro de cadmio con recubrimiento de MPA y MES                                                  |
| MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | heteroestructura de puntos cuánticos de seleniuro de cadmio conjugada con nanolaminas de nitruro de carbono grafítico |
| NHS                                          | N-hidroxisuccinimida                                                                                                  |
| PBS                                          | solución tampón de fosfato salino, pH 7,5                                                                             |
| RET                                          | transferencia de energía de resonancia                                                                                |
| RSD                                          | desviación estándar relativa                                                                                          |
| S                                            | sensibilidad analítica                                                                                                |
| STE                                          | esterigmatocistina                                                                                                    |
| STE-OH                                       | esterigmatocistina hemiacetal                                                                                         |
| TPrA                                         | tripropilamina                                                                                                        |
| TEA                                          | triethylamina                                                                                                         |
| Tris-HCl                                     | solución tampón clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano                                                          |
| $\Delta E_p$                                 | diferencia de potencial de pico anódico y catódico                                                                    |
| $\epsilon$                                   | coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )                                                           |
| $v$                                          | velocidad de la luz                                                                                                   |
| $\phi_{fl}$                                  | rendimiento cuántico de fluorescencia                                                                                 |
| $\tau$                                       | tiempo de vida de fluorescencia                                                                                       |

## Resumen

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se realizó la síntesis de puntos cuánticos de seleniuro de cadmio (CdSe) en solución acuosa estabilizados con una mezcla formada por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y ácido n-morfolino etanosulfónico (MES). Se investigó el cambio de los diversos parámetros de la síntesis como también de la relación MPA/MES. Los puntos cuánticos de CdSe se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades ópticas, electroquímicas y electroquimioluminiscentes, lo que permitió seleccionar aquellos con mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y alta emisión electroquimioluminiscente para ser utilizados, en una segunda instancia, para el desarrollo de sensores e inmunosensores electroquimioluminiscentes.

Adicionalmente, se sintetizaron heteroestructuras conjugadas formadas por puntos cuánticos de CdSe (MPA/MES CdSe) y g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>). Se realizó una caracterización fotofísica y electroquímica de las heteroestructuras conjugadas, en donde se determinó que la EQL de la heteroestructura conjugada responde a un mecanismo de transferencia electrónica, en donde el emisor luminiscente es el QD. La heteroestructura conjugada fue utilizada como sonda electroquimioluminiscente para la detección de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en matrices complejas, como suero humano liofilizado. El sensor resultó muy sensible, logrando un límite de detección de  $1,81 \times 10^{-3}$   $\mu$ M, además de presentar un bajo efecto debido a interferentes.

En una última etapa, se desarrolló un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de la micotoxina esterigmatocistina (STE). Para alcanzar el objetivo propuesto, se modificaron electrodos de óxido de indio y estaño (ITOs) con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, el que se utilizó como plataforma electroquimioluminiscente para la inmovilización de anticuerpos monoclonales anti STE (mAb-STE). La detección de STE se basó en un formato competitivo. El mismo necesitó de la conjugación de STE, por medio de un enlace covalente, con puntos cuánticos de CdSe, mediante el uso de L-lisina como espaciador. Se caracterizó el bioconjugado desarrollado por técnicas espectroscópicas y electroquímicas. La detección de STE en matrices complejas de extracto de granos de maíz se realizó a partir de la técnica EQL on-off, en donde la señal de EQL obedecen a un mecanismo de transferencia electrónica entre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los puntos cuánticos de CdSe. El inmunosensor presentó un límite de detección de  $9,77 \times 10^{-7}$  ng mL<sup>-1</sup>,

equivalente a  $6,97 \times 10^{-6} \mu\text{g Kg}^{-1}$  de STE en maíz, y porcentajes de recuperación entre 86,5% y 99,3%. El rendimiento del inmunosensor desarrollado fue comparado con HPLC UV-vis, obteniendo una excelente correlación entre ambos métodos. En resumen, esta Tesis Doctoral abarca aspectos tanto fisicoquímicos como analíticos, a partir de la síntesis de nanoestructuras y desarrollo de sensores/inmunosensores electroquimioluminiscentes. Se abordaron estudios fisicoquímicos de las nanoestructuras sintetizadas con el fin de comprender su comportamiento fotofísico y electroquímico, y su aplicación al desarrollo de sensores/biosensores, abordando así aspectos de la química analítica moderna.

## Summary

In this Doctoral Thesis work, a study was carried out on the synthesis of CdSe quantum dots stabilized with a mixture formed by 3-mercaptopropionic acid (MPA) and n-morpholino ethanesulfonic acid (MES) at different molar ratios (MPA/MES) with the aim of stabilizing the nanocrystals in aqueous solutions. The quantum dots were characterized according to their optical, electrochemical and electrochemiluminescent properties, which allowed the selection of quantum dots with higher quantum yield and higher electrochemiluminescent emission to be used, in a second instance, for the development of electrochemiluminescent sensors and immunosensors.

Additionally, heterostructures formed by CdSe (MPA/MES CdSe) quantum dots and g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) were synthesized. A photophysical and electrochemical characterization of the heterostructures was performed, where it was determined that the electrochemiluminescence of the heterostructure responds to a resonance energy transfer process, where the luminescent emitter is the quantum dot. The heterostructure was used as an electrochemiluminescent probe for the detection of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in human serum matrices. The sensor was found to be very sensitive, with a detection limit of  $1.81 \times 10^{-3}$   $\mu$ M, as well as selective.

In a final step, indium tin oxide electrodes (ITOs) were modified with g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, which was used as an electrochemiluminescent platform for immobilization of monoclonal antibodies (mAb-STE) for the development of an electrochemiluminescent immunosensor to detect the mycotoxin Sterigmatocystin (STE). The detection of STE was based on a competitive format, through the bioconjugation of STE covalently bound to CdSe quantum dots using L-lysine as a spacer. The developed bioconjugate was characterized by spectroscopic and electrochemical techniques. The detection of STE in complex matrices of corn extract was performed using the on-off electrochemiluminescence technique. The immunosensor presented a detection limit of  $9.77 \times 10^{-7}$  ng mL<sup>-1</sup>, equivalent to  $6.97 \times 10^{-6}$   $\mu$ g Kg<sup>-1</sup> of STE in corn, and recovery percentages between 86.5% and 99.3%. The performance of the immunosensor developed was compared with HPLC UV-Vis, obtaining an excellent correlation between both methods. In summary, this Doctoral Thesis covers both physicochemical and analytical aspects, from the synthesis of nanostructures and development of electrochemiluminescent sensors/immunosensors, based on photophysical and

electrochemical studies. Studies of the synthesized nanostructures were addressed to understand their photophysical and electrochemical behavior. The synthesized nanostructures were used in the development of sensors/immunosensors, thus addressing aspects of modern analytical chemistry.



# INTRODUCCIÓN

## 1. Preámbulo

La detección temprana de micotoxinas en alimentos constituye una prioridad global debido a su impacto sobre la salud pública, la inocuidad alimentaria y la economía productiva. Las micotoxinas son difíciles de eliminar en procesos industriales y pueden acumularse en cadenas de producción agrícola y ganadera<sup>1</sup> como en subproductos derivados. En este contexto, es continuo el desarrollo de métodos analíticos sensibles y accesibles para su detección con el objetivo de reducir pérdidas económicas y garantizar la seguridad alimentaria<sup>2</sup>.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por una gran variedad de mohos o microhongos filamentosos, como ser de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*, etc. Se caracterizan por su elevada estabilidad, su persistencia en alimentos y su capacidad para inducir efectos carcinogénicos, hepatotóxicos e inmunotóxicos en humanos y animales<sup>3</sup>. Suelen encontrarse en cereales (granos de maíz, sorgo, trigo, arroz y café, entre otros), oleaginosas (maní) y sus subproductos derivados. La contaminación de estas matrices se da en distintas etapas de la cadena de producción alimenticia, ya sea antes o después de la cosecha, siendo esta última la más importante. El riesgo de contaminación es mayor en regiones de clima cálido y húmedo, en donde las condiciones de actividad acuosa, temperatura y niveles de oxígeno son óptimas para que los hongos toxicogénicos produzcan toxinas<sup>4</sup>. En su gran mayoría, las micotoxinas son moléculas que poseen un peso molecular inferior a 450 g/mol, por lo que su tamaño es pequeño, resultando de gran importancia cuando se las quiere detectar mediante inmunoensayos.

El desarrollo de inmunoensayos para moléculas de pequeño tamaño es un desafío, ya que estos compuestos no pueden ser reconocidos simultáneamente por los anticuerpos, lo que impide su detección mediante formatos de inmunoensayos no competitivos de los sitios de unión, siendo esta la metodología habitual de detección. Estos inmunoensayos no competitivos son superiores a los ensayos competitivos en términos de sensibilidad, cinética y rango de trabajo, pero su aplicación queda limitada en el caso de moléculas pequeñas<sup>5</sup>. Para el caso de las micotoxinas, como consecuencia de sus efectos adversos y del riesgo que representan para la salud humana y animal, se ha impulsado el desarrollo de numerosas investigaciones y metodologías analíticas avanzadas orientadas a su detección, identificación y cuantificación en matrices en donde se las encuentra.

Una de las micotoxinas que ha ganado interés por sus posibles efectos en el hombre es la esterigmatocistina (abreviada como STE), una micotoxina producida principalmente por los hongos de los géneros *Aspergillus versicolor*<sup>6</sup> y *Aspergillus nidulans*<sup>7</sup>. STE, de acuerdo con la nomenclatura IUPAC, es la (3aR,12cS)-8-Hidroxi-6-metoxi-3a,12c-dihidrofuro[3',2':4,5]furo[2,3-h]pirano[3,2-b]xanten-2,9-diona. La estructura química de esta micotoxina consiste en un núcleo de xantona unido a una estructura bifuránica. Posee un peso molecular de 324,29 g/mol, un punto de fusión de 246 °C y es soluble en solventes orgánicos como metanol, etanol, acetonitrilo, benceno y cloroformo<sup>8</sup>. Se considera un precursor de las aflatoxinas (micotoxinas carcinogénicas más potentes) y pertenece al grupo de las furanocumarinas policétidas. Su presencia se ha detectado en alimentos, granos y cereales contaminados. STE actúa como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas y se ha asociado con efectos genotóxicos, por lo que su monitoreo y detección en matrices alimentarias es de gran importancia<sup>9</sup>.

La importancia para la salud pública acerca del control de micotoxinas ha hecho que se adopten regulaciones en diferentes alimentos y granos. La *Comisión del Codex Alimentarius* (dependiente de la ONU), establece métodos regulatorios a nivel mundial, y la *European Commission* (EC) cumple la misma función dentro del territorio perteneciente a la Unión Europea. Los métodos oficiales de determinación son aprobados por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) y *European Committee for Standardization* (CEN)<sup>10</sup>. Sin embargo, es continuo el interés en desarrollar nuevos dispositivos y técnicas de detección de micotoxinas en materias primas y sus subproductos alimenticios, suelos y aguas.

Por otro lado, dentro de la familia de pequeñas moléculas se encuentran moléculas con funciones biológicas, tal es el caso del peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), una molécula bioactiva con funciones fisiológicas, la que posee propiedades redox. Participa en rutas metabólicas fundamentales y su desregulación constituye un marcador temprano de estrés oxidativo, inflamación o daño tisular<sup>11</sup>. Detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> constituye una estrategia indirecta pero efectiva para monitorear la actividad de numerosas enzimas oxidativas y rutas redox celulares. Su detección en matrices complejas como el suero implica grandes desafíos debido a la presencia de proteínas séricas, quelantes naturales, antioxidantes, entre otros, que disminuyen la estabilidad del analito o generan señales inespecíficas. Se han implementado diversas metodologías analíticas para su determinación, dentro de las

cuales se encuentran los ensayos colorimétricos basados en enzimas peroxidadas<sup>12</sup>, técnicas fluorescentes con sondas específicas<sup>13</sup> (Amplex Red, peroxiredoxinas modificadas), métodos electroquímicos voltamperométricos y amperométricos a partir de sensores nanoestructurados (metal – nanozymes, óxidos metálicos, puntos cuánticos) y estrategias de quimioluminiscencia empleando luminol o derivados acridínicos<sup>14,15</sup>.

A pesar de los avances logrados en las últimas décadas, aún persiste una brecha significativa en herramientas analíticas para la detección eficaz de diversos analitos, especialmente aquellos presentes en matrices complejas. Las metodologías actuales suelen requerir pretratamientos laboriosos, instrumentación costosa o etapas de separación que dificultan el monitoreo rápido y accesible. En tal sentido, el desarrollo de sensores y biosensores ha ganado interés. Estos dispositivos se basan en el acople entre un transductor, con una capa de reconocimiento química (sensores químicos) o bioquímica, como modificación con enzimas o anticuerpos capaces de reconocer a una molécula objetivo (biosensores)<sup>21</sup>.

Actualmente, el desarrollo de sensores/biosensores se lleva a cabo haciendo uso de nanomateriales con el propósito de mejorar las características analíticas de los sensores/biosensores convencionales ampliando las posibilidades de su aplicación<sup>16</sup>. En tal sentido, se han usado diferentes nanomateriales en dispositivos electroquímicos y electroquimioluminiscentes para la detección de micotoxinas de relevancia, ya sea mediante la modificación de la superficie de electrodos y/o su utilización como elementos de marcado o conjugado<sup>17,18</sup>.

Al desarrollar un método de detección se deben tener en cuenta varios factores, tales como su sencillez en la fabricación y en la implementación, alta sensibilidad y bajo costo. Es por ello por lo que se han diseñado métodos y dispositivos de detección que combinan propiedades de materiales nanométricos como puntos cuánticos semiconductores (QD por sus siglas en ingles), conjugados con elementos de reconocimiento biológicos, entre los que se destacan los anticuerpos (Ab)<sup>19</sup>, los cuales gracias a su alta selectividad hacia un antígeno específico (Ag), como por ejemplo las micotoxinas<sup>20</sup>, son una gran alternativa para el diseño y la fabricación de inmunosensores. Cuando un anticuerpo es unido a un electrodo, se forman un inmunosensor electroquímico<sup>21</sup>, y la interacción del Ag con el Ab se cuantifica a través de una reacción electroquímica<sup>22</sup>.

Una alternativa es la combinación de técnicas electroquímicas con procesos de emisión de radiación electromagnética. Así, cuando un Ab es inmovilizado sobre la superficie de un electrodo y se lleva a cabo la interacción con el Ag, se puede producir un proceso de emisión de luz a partir de una reacción electroquímica, dando lugar a los inmunosensores electroquimioluminiscentes<sup>23,24</sup>. Los inmunosensores ofrecen ventajas significativas en términos de sensibilidad, selectividad y rapidez de análisis, lo que los convierte en herramientas valiosas para el monitoreo y control<sup>25</sup>. Con la inclusión de nanomateriales en el desarrollo de inmunosensores se pretende mejorar la sensibilidad debido a la amplificación de la señal, el aumento de la superficie disponible para la interacción con el analito de interés, como así también mejorar las propiedades electrónicas, mecánicas y ópticas características de las nanoestructuras utilizadas<sup>18</sup>.

La detección de STE mediante inmunosensores electroquimioluminiscentes representa una estrategia sensible y selectiva para el monitoreo de esta micotoxina en matrices complejas. La bioconjugación de STE con QD de CdSe permiten aprovechar sus propiedades redox y luminiscentes como marcadores para ensayos de EQL, dando lugar a herramientas analíticas poderosas con aplicaciones directas en la vigilancia de la seguridad alimentaria y ambiental.

El enfoque desarrollado en esta tesis propone aportes originales en la integración de QD de CdSe y nitruro de carbono grafitico dentro de un formato de inmunosensor electroquimioluminiscente orientado a la detección de moléculas de bajo peso molecular como STE. Esta propuesta combina heteroestructuras semiconductoras con reconocimiento molecular selectivo para generar plataformas analíticas con alta sensibilidad y aplicabilidad directa en matrices complejas, un área donde la literatura aún presenta vacíos significativos. Además, el diseño de nuevas arquitecturas de nanomateriales conjugados, además, permite generar aportes para al desarrollo de sensores para la detección de moléculas de importancia biológica como lo es el peróxido de hidrogeno en matrices complejas.

## 2. Antecedentes y estado del arte

La importancia de los puntos cuánticos de CdSe se remonta a la década de 1990, cuando se implementaron como nanomaterial modelo para estudiar efectos cuánticos y desarrollar aplicaciones optoelectrónicas y bioanalíticas<sup>26</sup>. Se demostró que nanocristales semiconductores exhiben confinamiento cuántico dentro de matrices vítreas, estableciendo las bases conceptuales de la física cuántica en nanomateriales<sup>27</sup>. Estudios posteriores confirmaron la dependencia del band gap con el tamaño en nanocristales dispersos en solución, consolidando la comprensión teórica del fenómeno<sup>28</sup>. A partir del descubrimiento de las propiedades de los nanocristales sintetizados, los puntos cuánticos se utilizaron en múltiples disciplinas, siendo parte del avance tecnológico del siglo XXI.

El uso de los puntos cuánticos como marcadores luminiscentes fue una de las aplicaciones con mayor impacto tras su implementación. A partir de la obtención de puntos cuánticos funcionalizados se demostró que estos pueden unirse con biomoléculas en reacciones de bioconjugación, lo que permitió utilizarlos como marcadores luminiscentes altamente brillantes, fotoestables y sintonizables, lo que representó una ventaja significativa frente a los fluoróforos orgánicos tradicionales. En un estudio pionero, los puntos cuánticos de CdSe recubiertos con ZnS fueron funcionalizados con estreptavidina con el objetivo de dirigirse selectivamente hacia estructuras biológicas en células fijas,<sup>29</sup>. Así mismo, se reportaron síntesis de bioconjugados de puntos cuánticos semiconductores unidos a anticuerpos mediante grupos carboxilatos superficiales para la detección ultrasensible en inmunoensayos<sup>30</sup>. La capacidad de ajustar la energía de emisión, junto con la fácil incorporación de grupos funcionales para bioconjugación (tioles, carboxilos, aminas), convirtió a los puntos cuánticos en plataformas versátiles para la construcción de biosensores altamente sensibles y específicos.

La introducción de sondas compuestas por nanomateriales conjugados con propiedades electroquimioluminiscentes se ha convertido en una alternativa para su uso en detección en sistemas acuosos, ya que sus propiedades pueden ajustarse en la síntesis y conjugación de estos<sup>31</sup>. El nitruro de carbono grafítico<sup>32,33</sup> (abreviado g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) es un material semiconductor conocido por su alta estabilidad química, biocompatibilidad y estructura con defectos que facilitan su funcionalización, lo cual lo hace ideal para aplicaciones en sensores y biosensores<sup>34</sup>. La conjugación del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con materiales luminiscentes<sup>35</sup>,

como puntos cuánticos, puede producir efectos de amplificación de señal, incrementando la sensibilidad del sistema. Esto convierte al g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en una sonda eficaz y altamente sensible. Por su estructura  $\pi$  conjugada, alta densidad de sitios N y presencia de grupos aminas superficiales, el nitruro de carbono grafítico se combina eficazmente con sulfuros de cadmio (CdS), óxidos (TiO<sub>2</sub>), materiales carbonosos (grafeno/GO), disulfuro de molibdeno (MoS<sub>2</sub>) y nanopartículas metálicas (Au, Ag), dando lugar a nanocompuestos que han sido explotados como transductores en sensores fotoelectroquímicos, electroquímicos y electroquimioluminiscentes. Estas plataformas han permitido la detección de analitos como, por ejemplo, tetraciclinas y adenosina mediante CdS/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub><sup>36</sup>, nitrito y otras especies redox con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, y neurotransmisores o ácido úrico con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/grafeno, mostrando mejoras importantes en sensibilidad y límites de detección frente a los materiales no híbridos<sup>37</sup>.

Como alternativa en el desarrollo de inmunoensayos para la detección de, por ejemplo, micotoxinas, las heteroestructuras basadas en la conjugación de nanomateriales unidas a biomoléculas ha despertado un interés. Puntos cuánticos semiconductores fueron utilizados en inmunoensayos multicolor. Si bien el estudio se focalizó en nanocristales silanizados, sentó un precedente al mostrar la viabilidad de los puntos cuánticos como marcadores robustos y altamente sensibles para micotoxinas como zearalenona (ZEN) y deoxinivalenol (DON). Dentro de los estudios realizados en donde se integró directamente g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con otros nanomateriales, se encuentran desarrollos de sensores fotoelectroquímicos basados en plataformas híbridas g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/BiOBr con crecimiento in situ de puntos cuánticos de Ag<sub>2</sub>S, aplicados a la detección de la micotoxina zearalenona, en donde se ilustró cómo la heterounión aumenta la eficiencia de conversión fotoelectroquímica y amplifica la señal analítica, permitiendo bajos límites de detección en matrices agrícolas reales<sup>38</sup>. Otro antecedente relevante es aquel en donde se realizó la unión de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con Ag<sub>2</sub>O como plataforma de reconocimiento para un inmunosensor electroquímico destinado a la detección de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche. Aunque no incorpora directamente puntos cuánticos semiconductores, este estudio demostró la efectividad del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> como interfaz<sup>39</sup>. A pesar del notable avance en el empleo de nanomateriales para la detección de micotoxinas, aún persisten deficiencias que limitan su adopción rutinaria en sistemas regulatorios y en análisis de campo.

Respecto específicamente a STE, se desarrollaron sensores fluorescentes basados en polímeros molecularmente impresos incorporando puntos cuánticos de carbono (CD@MIP), que actúan como sondas luminiscentes con cavidades de reconocimiento específicas para STE y permiten detecciones directas en granos<sup>40</sup>. Además, se desarrollaron técnicas electroquímicas basadas en la modificación de electrodos serigrafiados o carbono vítreo con nanomateriales ricos en carbono como nanotubos de carbono, grafeno, entre otros, para determinar STE por voltamperometría de pulso o voltamperometría de onda cuadrada con límites de detección altamente sensibles<sup>41,42</sup>.

La determinación de STE en alimentos ha evolucionado desde métodos instrumentales robustos (HPLC-FLD, LC-MS/MS) hasta técnicas rápidas de cribado (ELISA, tiras de flujo lateral) y aproximaciones analíticas innovadoras que incorporan nanomateriales. Los métodos basados en LC-MS/MS y variantes multi micotoxina (incluyendo enfoques dilute and shoot o quechers) son hoy por hoy el estándar para análisis cuantitativo en matrices complejas, ofreciendo sensibilidad y especificidad adecuadas<sup>43,44</sup>. Además, se han reportado aptasensores electroquimioluminiscentes para aflatoxina en leche, inmunoensayos electroquimioluminiscentes para AFB<sub>1</sub> y ocratoxina A con límites de detección en rangos fento – pico molar, gracias al uso de nanomateriales capaces de amplificar la respuesta de detección como es el caso de las nanopartículas de Au, heterouniones de Pd/GO, QD@MOF y matrices mesoporosas<sup>45,46</sup>.

### 3. Justificación

La motivación científica de este trabajo radica en explorar nanomateriales con propiedades semiconductoras, luminiscentes y de superficie capaces de potenciar la conversión y amplificación de señal para desarrollar sensores e inmunosensores electroquimioluminiscentes. La necesidad de tecnologías analíticas impulsa la exploración de arquitecturas innovadoras que superen las limitaciones de los métodos en vigencia.

El desarrollo de inmunosensores para la detección de moléculas de bajo peso molecular como la STE presenta desafíos significativos asociados a mecanismos de desarrollo de una señal cuantificable. Frente a esta situación, la combinación de QD de CdSe, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y un sistema inmunológico de reconocimiento específico surge como una alternativa sólida para el desarrollo de un inmunosensor electroquimioluminiscente capaz de detectar STE con precisión en matrices complejas. Si bien existen métodos cromatográficos e inmunológicos consolidados para la determinación de micotoxinas, el desarrollo de herramientas y metodologías simples de detección de STE continúa siendo de gran interés.

Asimismo, la incorporación de heteroestructuras basado en la unión de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y QD de CdSe permite el diseño de metodologías electroquimioluminiscentes para la detección de y cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una molécula clave en rutas redox y procesos celulares. La sinergia entre ambos nanomateriales potencia la transferencia y separación de cargas foto - electrogeneradas, incrementa la eficiencia cuántica del sistema y favorece la generación de especies reactivas responsables de la señal electroquimioluminiscente. Las heteroestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@CdSe ofrecen propiedades complementarias, permite acelerar las rutas redox involucradas en la emisión electroquimioluminiscente y mejora la sensibilidad frente a variaciones mínimas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además de su impacto analítico, la síntesis y caracterización de nanomateriales semiconductores como los nombrados previamente permite su estudio desde áreas de la ciencia como la fotofísica, fotoquímica y como la electroquímica, enriqueciendo la formación. Este enfoque multidisciplinar de fotofísica, fotoquímica, electroquímica y química analítica abre nuevas líneas de investigación, aplicada al potencial desarrollo de sensores de analitos de interés, como lo son la micotoxina STE y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **4. Hipótesis y objetivos**

### **4.1. Hipótesis**

La *hipótesis* en la cual se sustenta la Tesis Doctoral radica en la generación de nuevas superficies electródicas nanoestructuradas que permitan la inmovilización adecuada de anticuerpos, como así también la generación de nuevos marcadores redox y luminiscentes que se utilizarán para el conjugado de moléculas de bajo peso molecular que, por sí solas, no son capaz de inducir una respuesta inmunológica, pero que pueden ser reconocidas específicamente por anticuerpos cuando se encuentra unida covalentemente a una proteína portadora, denominadas haptenos. Así, se espera que los sensores/inmunosensores resultantes muestren buen rendimiento y alta sensibilidad en comparación con las metodologías de detección vigentes de moléculas de bajo peso molecular. Como prueba de concepto se utilizó la micotoxina esterigmatocistina, que contamina diferentes granos y cereales.

### **4.2. Objetivos generales**

Diseñar y desarrollar novedosos inmunosensores electroquimioluminiscentes usando haptenos convencionales. Además, estudiar los aspectos fundamentales de la inmovilización de biomoléculas (fundamentalmente anticuerpos) sobre transductores electroquímicos nanoestructurados y la conjugación de anticuerpos en la etapa de detección. Evaluar las aplicaciones analíticas de los biosensores resultantes para la cuantificación sensible y selectiva de analitos de bajo peso molecular y, así, generar herramientas alternativas para el control del medio ambiente. Desde este punto de vista, se eligieron, como prueba de concepto la micotoxina esterigmatocistina producida por diferentes hongos, como lo son los del género *Aspergillus* y *Penicillium*.

### 4.3. Objetivos específicos

1. Diseñar, estudiar y caracterizar nuevos sensores e inmunosensores electroquimioluminiscentes, inmovilizando sobre electrodos nanoestructurados el anticuerpo para la determinación del analito de interés. Calcular los parámetros característicos de los sensores e inmunosensores resultantes.
2. Para la inmovilización del anticuerpo sobre el electrodo, se estudiarán las propiedades de superficies electródicas modificadas con diferentes materiales candidatos, fundamentalmente óxido de grafeno (OG), dispersiones de nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) en polímeros de diferente naturaleza, nitruro de carbono grafitico y/o polímeros orgánicos conductores (POC), con la finalidad de retener y mantener la actividad del anticuerpo. Estudiar las propiedades de electrodos nanoestructurados usando pares redox modelos.
3. Sintetizar y caracterizar puntos cuánticos de metales semiconductores (QDots) y/o nanopartículas de polímeros orgánicos semiconductores (PDots), y evaluar su uso como marcadores electroquimioluminiscentes en los inmunoensayos resultantes.
4. Estudiar la vía de conjugación de los correspondientes haptenos con los QDots y/o PDots sintetizados. Evaluar la aplicación del conjugado resultante en la etapa de detección de los analitos de interés para la cuantificación de la reacción de inmuno reconocimiento.
5. Aportar conocimientos relacionados con el desarrollo y validación de nuevas metodologías analíticas en la detección y cuantificación selectiva de micotoxinas en matrices naturalmente contaminadas como maíz, soja, trigo, cebada para las micotoxinas, basados, fundamentalmente, en el diseño y desarrollo de los inmunosensores electroquimioluminiscentes. Evaluar sus aplicaciones analíticas para la determinación de estos compuestos de interés en la industria agropecuaria y agroalimentaria.



# MARCO TEÓRICO

## 5. Nanomateriales semiconductores

Cuando se habla de un semiconductor, se hace referencia a un tipo de material cuya capacidad para conducir electricidad se encuentra en el rango medio entre la de un conductor (como los metales) y un aislante (como el vidrio). Esto significa que, en condiciones normales, los semiconductores no son completamente buenos conductores de electricidad, pero tampoco son completamente aislantes. Esta propiedad intermedia se puede modificar y controlar bajo ciertas condiciones como, por ejemplo, a partir de su síntesis y modificación de sus propiedades físico - químicas<sup>47</sup>.

Muchos de los nanomateriales comúnmente diseñados están compuestos en su estructura por metales, semiconductores, cerámicas, compuestos orgánicos, polímeros e incluso materiales derivados de compuestos biológicos como fagos, anticuerpos, fragmentos de ADN, aminoácidos, proteínas, entre otros<sup>48</sup>. La unión de nanomateriales con fragmentos de materiales para la formación de matrices complejas, se denomina nanocompuestos<sup>49</sup>.

Los materiales nanocompuestos se pueden clasificar de acuerdo con la escala dimensional, en donde una, dos o tres dimensiones están en el rango nanométrico. En cuanto a las dimensiones de los nanomateriales y nanocompuestos, pueden clasificarse como de dimensión cero (0D) aquellos nanomateriales que tienen las tres dimensiones dentro del rango nanométrico. Los puntos cuánticos (Quantum Dots, QDs por sus siglas en inglés), los fullerenos y las nanopartículas (NPs) son ejemplos de nanomateriales 0D. Dependiendo de su método de síntesis y formación, su estructura puede ser amorfa o cristalina (monocristalina o policristalina)<sup>50</sup>.

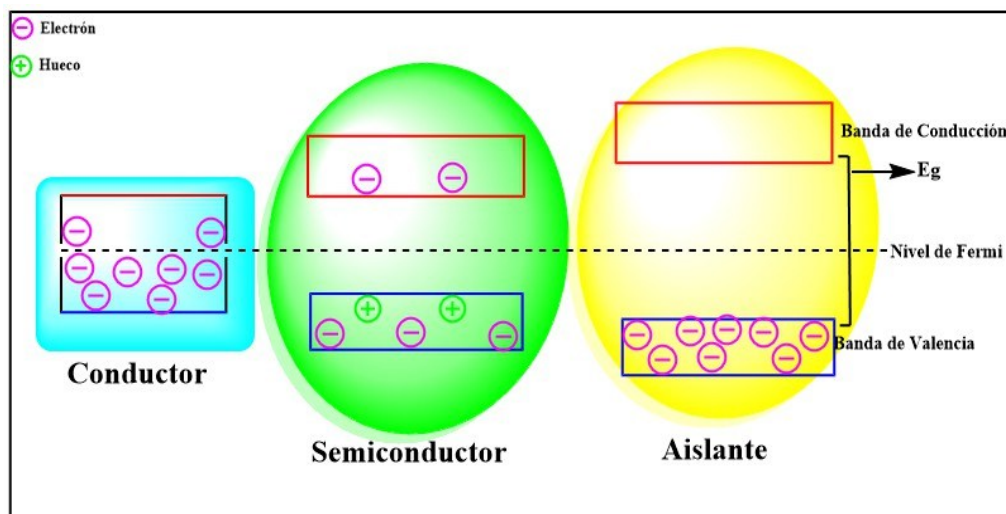
Se encuentran además los nanomateriales unidimensionales (1D) es decir, aquellos que tienen dos de sus tres dimensiones en el rango de la nanoescala. En cuanto a la estructura de los 1D, pueden ser amorfos o cristalinos (monocristalinos o policristalinos), químicamente puros o impuros, materiales independientes o incrustados en una matriz o clústeres de nanomateriales.

Los nanomateriales bidimensionales (2D) son aquellos nanomateriales que contienen solo una dimensión en nanoescala, mientras que las otras dos no. En este grupo de nanomateriales 2D se pueden encontrar películas delgadas, nanoplacas y nanorecubrimientos, tanto cristalinos como amorfos, de una o varias capas<sup>51</sup>. En ellos hay un confinamiento de electrones solo en una dirección. Ejemplos destacados incluyen el

grafeno<sup>52</sup>, compuesto de una sola capa de átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal, cuando tienen dos dimensiones en la escala nanométrica, mientras que la tercera dimensión puede ser mayor. Recientemente se agregó una tercera categoría de nanomaterial, el nanomaterial tridimensional (3D)<sup>53</sup>.

En cuanto a su estructura de bandas de energía, los semiconductores se componen de una banda de valencia (BV) con electrones en todos sus subniveles y una banda de conducción (BC) en donde los electrones pueden moverse libremente. Entre estas dos bandas, existe una diferencia de energía que debe ser superada para que los electrones se desplacen desde la BV hacia la BC. Esta diferencia energética se denomina banda prohibida, siendo esta brecha de energía la característica más distintiva de un semiconductor<sup>54</sup>.

En materiales conductores, principalmente los metales como elementos representativos de este grupo, las BV y BC se encuentran superpuestas o en contacto lo que permite la promoción de electrones entre la banda de menor a la de mayor energía. En los aislantes, por otro lado, esa barrera energética es muy grande dificultando el transporte de un electrón desde la banda de valencia hacia la banda de conducción trayendo como resultado la eliminación del proceso de conducción. La Figura 1 muestra la estructura de cada tipo de material.



**Figura 1.** Representación de las bandas de energía en materiales conductores, semiconductores y aislantes.

Los nanomateriales semiconductores presentan propiedades y funcionalidades que los distinguen de los materiales a granel, destacando características únicas que incluyen espectros de emisión estrechos, bandas de absorción continua y alta estabilidad. Además, tienen la ventaja de generar diferentes funcionalidades en su superficie. La síntesis de nanopartículas semiconductoras ha sido de amplio estudio en la última década con altos avances y desarrollo en el campo de la nanoquímica<sup>55</sup>. Estos materiales poseen propiedades físicas y químicas notables, lo que los convierte en sujetos de amplia investigación y aplicación en diversos campos. El movimiento de electrones y huecos dentro de estos materiales está determinado por el confinamiento cuántico, responsable de las características ópticas de los nanomateriales. Así, el tamaño y la forma de estos nanomateriales afectan las propiedades de transporte de fonones (modos vibracionales) y fotones (partículas de luz)<sup>56</sup>.

### **5.1. Clasificación de los nanomateriales semiconductores**

Los nanomateriales semiconductores se pueden agrupar en dos categorías bien definidas, las cuales se denominan nanomateriales semiconductores intrínsecos y extrínsecos<sup>57</sup>. A continuación, se describirá cada uno de estos grupos.

#### **5.1.1. Nanomaterial semiconductor intrínseco**

Este tipo de nanomateriales se considera que el número de huecos en la BV es igual al número de electrones en la BC. La banda prohibida en tales semiconductores es muy pequeña e incluso la energía disponible a temperatura ambiente es suficiente para que los electrones de la BV salten a la BC<sup>58</sup>.

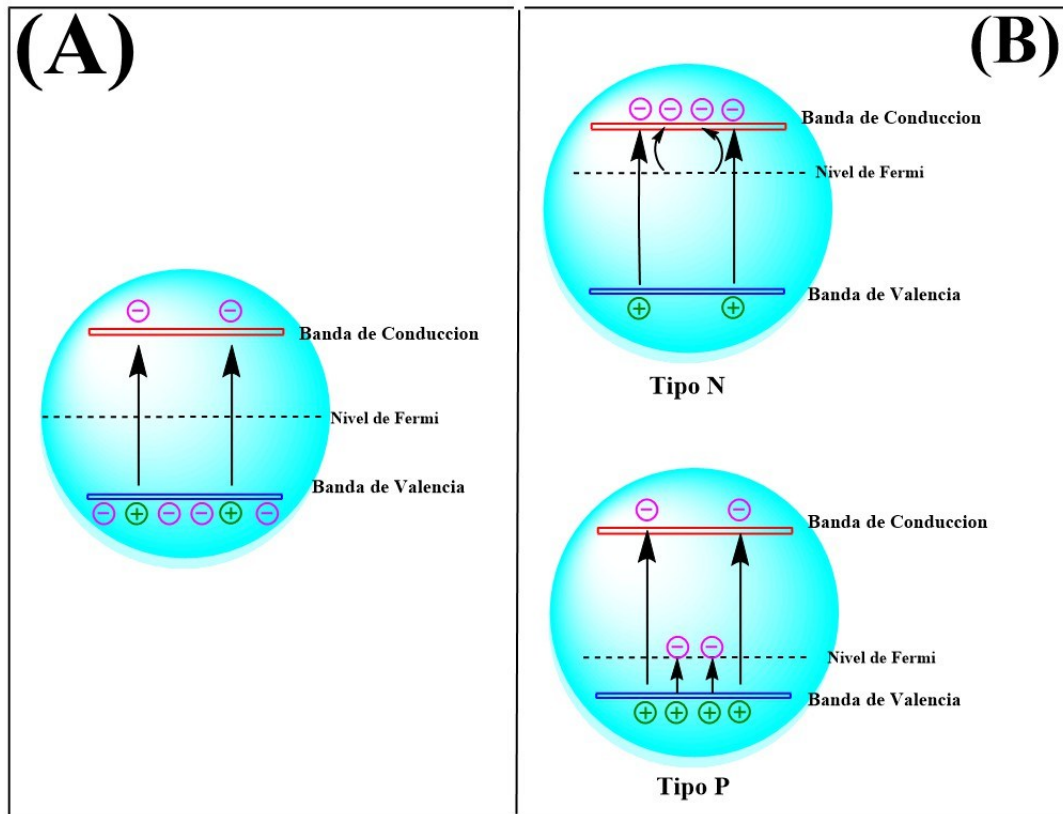
El nivel de Fermi ( $E_f$ ) se encuentra en algún lugar entre las bandas. Si se aplica una diferencia de potencial a través de un semiconductor intrínseco, los electrones se moverán hacia el terminal positivo mientras que los huecos se desplazarán hacia el terminal negativo. La corriente total dentro del semiconductor será la suma de la corriente debida a los electrones libres y los huecos. La Figura 2 (A) describe los nanomateriales semiconductores intrínsecos.

### 5.1.2. Nanomaterial semiconductor extrínseco

Se trata de nanomateriales semiconductores en los que el estado puro del material semiconductor se diluye deliberadamente añadiendo cantidades muy pequeñas de impurezas. Las impurezas se conocen como dopantes o agentes dopantes. Al añadir impurezas en su estructura, su conductividad y sus propiedades se mejoran en comparación con los nanomateriales semiconductores intrínsecos<sup>59</sup>. Cuando se dopan nanomateriales semiconductores con elementos del grupo III A o elementos del grupo V A, se forman semiconductores de tipo p o de tipo n, respectivamente. Cuando se dopa un material semiconductor con un elemento del grupo III A, el átomo trivalente dona solo tres electrones al átomo tetravalente, dejando un hueco para que se rellene con un electrón. Esto da como resultados más huecos que electrones y se denomina semiconductor de tipo P (referente a carga positiva), siendo los huecos los portadores de carga mayoritarios en los semiconductores de tipo P, mientras que los electrones son portadores minoritarios<sup>60</sup>.

Por otro lado, cuando el dopante es un elemento del grupo V A, este dona un electrón adicional en la estructura cristalina que no es necesario para fines de enlace covalente, así el electrón se desplaza a la banda de conducción siendo un electrón en exceso. Por lo tanto, al doparlo con un elemento de este tipo, el material de base contiene más electrones que huecos, de ahí la nomenclatura, semiconductores extrínsecos de tipo N (referente a carga negativa). Los electrones son los portadores de carga mayoritarios mientras que los huecos son portadores minoritarios<sup>61</sup>.

En relación con el nivel de Fermi en este tipo de nanomateriales semiconductores, en el caso del tipo n se desplaza hacia la BC mientras que en el caso del tipo p se desplaza hacia la BV. La Figura 2 (B) representa los nanomateriales semiconductores extrínsecos tipo N (arriba) y tipo P (abajo).



**Figura 2.** Clasificación de los nanomateriales semiconductores (A) intrínsecos y (B) extrínsecos del tipo N (arriba) y del tipo P (abajo).

## 6. Puntos cuánticos semiconductores

Los puntos cuánticos (QD) están formados a partir de elementos químicos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI. Dentro de este grupo encontramos los QD CdS, CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe), así como también GaAs, GaP, GaN, InAs, InP y finalmente QD de PbS, PbSe, PbTe. Tal y como se definió anteriormente, la terminología de QD, hace referencia a nanocristales de tamaños inferiores a 10 nm. En estos nanomateriales hay una zona prohibida en la cual no existen estados energéticos. Un electrón cuando alcanza este nivel energético saltará desde una banda electrónica a otra, dando lugar a la formación de un par  $h^+ - e^-$ . Este nivel de energía límite es conocida como el nivel de energía de Fermi<sup>62</sup>. La región energética que existe entre la BV y la BC es la diferencia entre el máximo nivel energético de la primera respecto al mínimo nivel de energía de la segunda, debido a que aparecen en esta región niveles intermedios que no pueden ocupar los electrones.

$E_g$  depende del tamaño del QD<sup>63,64</sup>. El nivel superior de la BV se encuentra lleno de electrones, mientras que el nivel inferior de la BC permanece vacío lo que permite que los electrones puedan saltar entre bandas, pasando por la banda de energía prohibida. El electrón y el hueco interactúan por fuerzas electrostáticas, dando lugar a una partícula cuasi eléctricamente neutra conocida como excitón cuyo valor de tamaño está determinado por las funciones de onda y las distribuciones de posición de electrones y huecos. La ecuación del Radio de Bohr permite conocer el radio del excitón formado<sup>65</sup>:

$$a_b = a_e + a_h = \frac{\epsilon h}{e^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) \quad (1)$$

de la ecuación (1),  $a_b$  es el radio de Bohr,  $a_e$  y  $a_h$  son el radio de Bohr del electrón y el hueco respectivamente,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del material,  $h$  es la constante de Planck,  $e$  es la carga del electrón,  $m_e$  la masa del electrón y  $m_h$  la masa efectiva del hueco formado. Cuando el Radio de Bohr del excitón es del orden del radio del QD semiconductor el movimiento de los electrones entre bandas se encuentra confinado de tal manera que los niveles de energía, en lugar de ser continuos, son discretos, en donde los nanocristales más pequeños tienen brechas energéticas más grandes ( $E_g$  mayores), siendo este fenómeno común en puntos cuánticos semiconductores.

La determinación del tamaño de un QD se puede calcular, aproximadamente, mediante el valor de  $E_g$ . Uno de los modelos empleados para la determinación de la energía  $E_g$  es mediante el método desarrollado por Brus y col. el cual se basa en que el excitón dentro del nanocristal se comporta según el modelo mecano - cuántico de una partícula en un pozo de potencial<sup>66</sup>. Tomando como relación el tamaño de partícula (asumiendo una forma esférica) y su banda prohibida resultante, se puede expresar el  $E_g$  en función del radio del QD (2):

$$E_g = E_g^{bulk} + \frac{h^2}{8m_0r^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{CdSe}r} \quad (2)$$

donde  $E_g$  es la banda prohibida del QD,  $E_g^{bulk}$  es la banda prohibida del material a granel,  $r$  es el radio del nanocristal,  $m_0$  es la masa del electrón,  $m_e^*$  es la masa efectiva del electrón en el material,  $m_h^*$  es la masa efectiva del hueco en el material,  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío y  $\epsilon_{CdSe}$  es la permitividad del material. El modelo de Brus generalmente coincide con resultados experimentales, pero para nanopartículas de menor tamaño sobrestima el  $E_g$  debido a que no se contemplan efectos de la red cristalina del material ni la interacción

de intercambio entre el hueco y el electrón. Si bien no es el mejor ajuste a los valores experimentales, esta ecuación muestra que la banda prohibida y la longitud de onda de la luz emitida, cambia de manera significativa con pequeños cambios en el tamaño de la nanopartícula.

### 6.1. Propiedades electrónicas y ópticas de puntos cuánticos semiconductores

Mientras que la energía de los bordes de banda determina la reactividad química de un material semiconductor, el  $E_g$  determina las propiedades ópticas y electrónicas. El movimiento de los electrones desde la BV a la BC se encuentra confinado de manera tridimensional gracias a la estructura del QD, razón por la que los electrones pueden presentar trayectorias directas e indirectas de una banda a la otra. Considerando sólo una dimensión, la energía de los niveles cuánticos del electrón y del hueco, se pueden derivar de la ecuación de Schrödinger y la solución exacta está dada por la ecuación<sup>67</sup>:

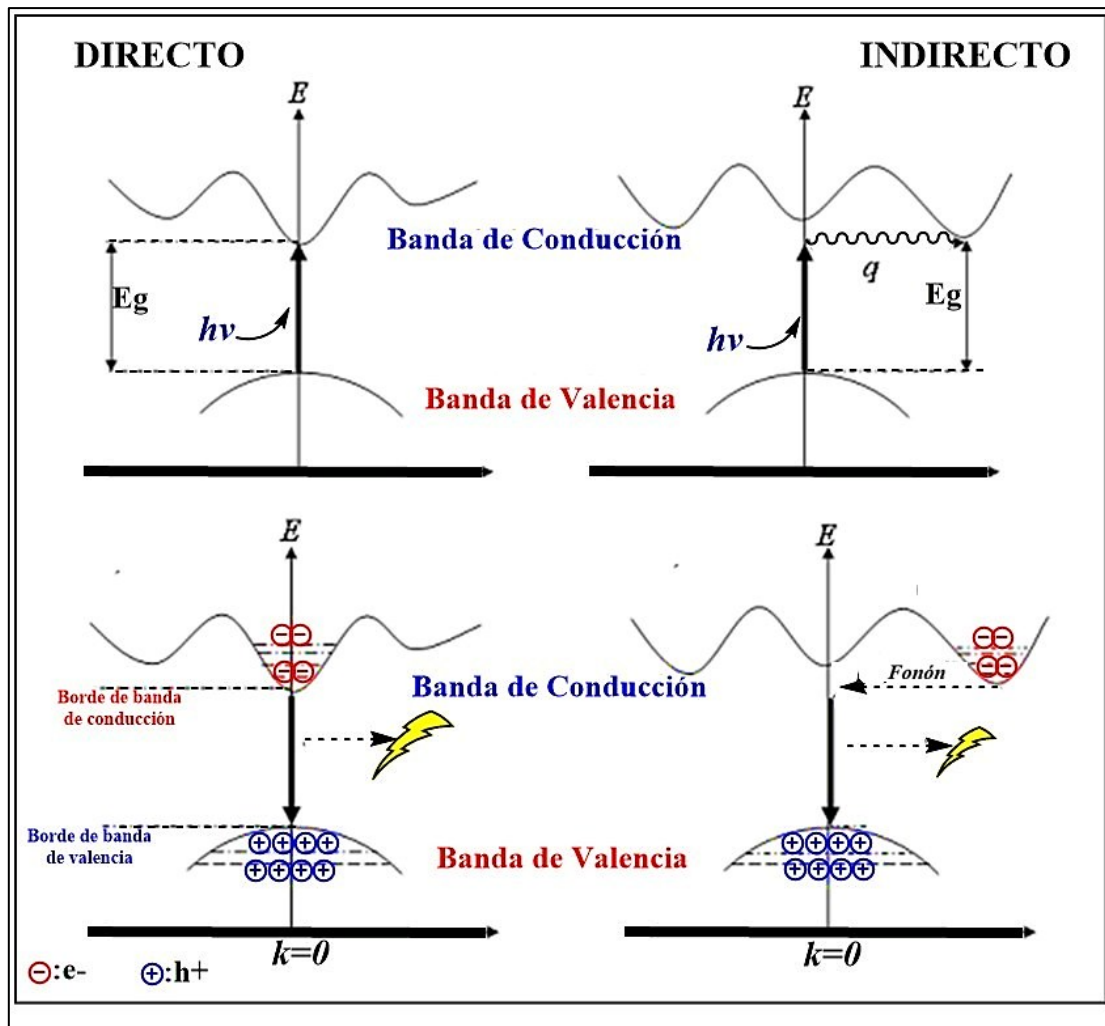
$$E_c = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_e^*} + E_g \quad (3)$$

De la anterior expresión, la distribución continua de estados permitidos en un cristal masivo y la banda son dependientes de  $k$ , término que hace referencia al vector de onda de desplazamiento del electrón y la curvatura de la banda es característica de la masa efectiva del electrón y huecos excitados. Una de las maneras de representar este vector de onda es a través del diámetro del cristal, a partir de la longitud de onda de absorción. Así, el vector de onda energético se representa como  $k = 2\pi/\lambda$ , donde  $k$  es inversamente proporcional al radio del cristal. Cuando el radio es grande,  $k$  es casi continua y  $E_c$  también lo es (es decir, pierde la discretización de los estados de energía). Sin embargo, cuando se reduce a una escala nanométrica,  $k$  y  $E_c$  toman valores discretos, y aumenta la separación entre estados.

Las transiciones intrabanda a partir de la absorción de fotones permite la formación de un electrón - hueco; fenómeno que depende de la posición de los niveles energéticos de la banda de valencia y la banda de conducción<sup>68</sup>. Los fotones solo tienen un vector  $k$  asociado, por lo que los desplazamientos siguen una trayectoria energética determinada. Así, cuando la energía absorbida es mayor o igual a  $E_g$  y la BV se encuentra sobre el

mismo vector de onda ( $k = 0$ ) hay una transición directa. En el caso en que la energía absorbida sea menor que la energía de la banda prohibida no habrá absorción (Figura 3, parte superior).

Por otro lado, una transición es indirecta cuando los límites energéticos de BV y BC no se encuentran sobre el mismo vector de onda ( $k \neq 0$ ) razón por la cual ocurre un efecto vibracional adicional que permite el desplazamiento del electrón a su estado inicial desde la BC a la BV. Para transiciones indirectas, el vector de desplazamiento del electrón desde su estado excitado hacia su estado basal (Figura 3, parte inferior) se encuentra asociado a un proceso mecánico cuántico de segundo orden en el que un fotón puede ser destruido y crear un fonón<sup>69</sup> el cual se expresa como energía asociada a ondas sonoras o térmicas características de transiciones no luminiscentes.



**Figura 3.** Transición intrabanda directa e indirecta para un punto cuántico semiconductor (arriba); emisión de luminiscencia directa e indirecta (abajo).

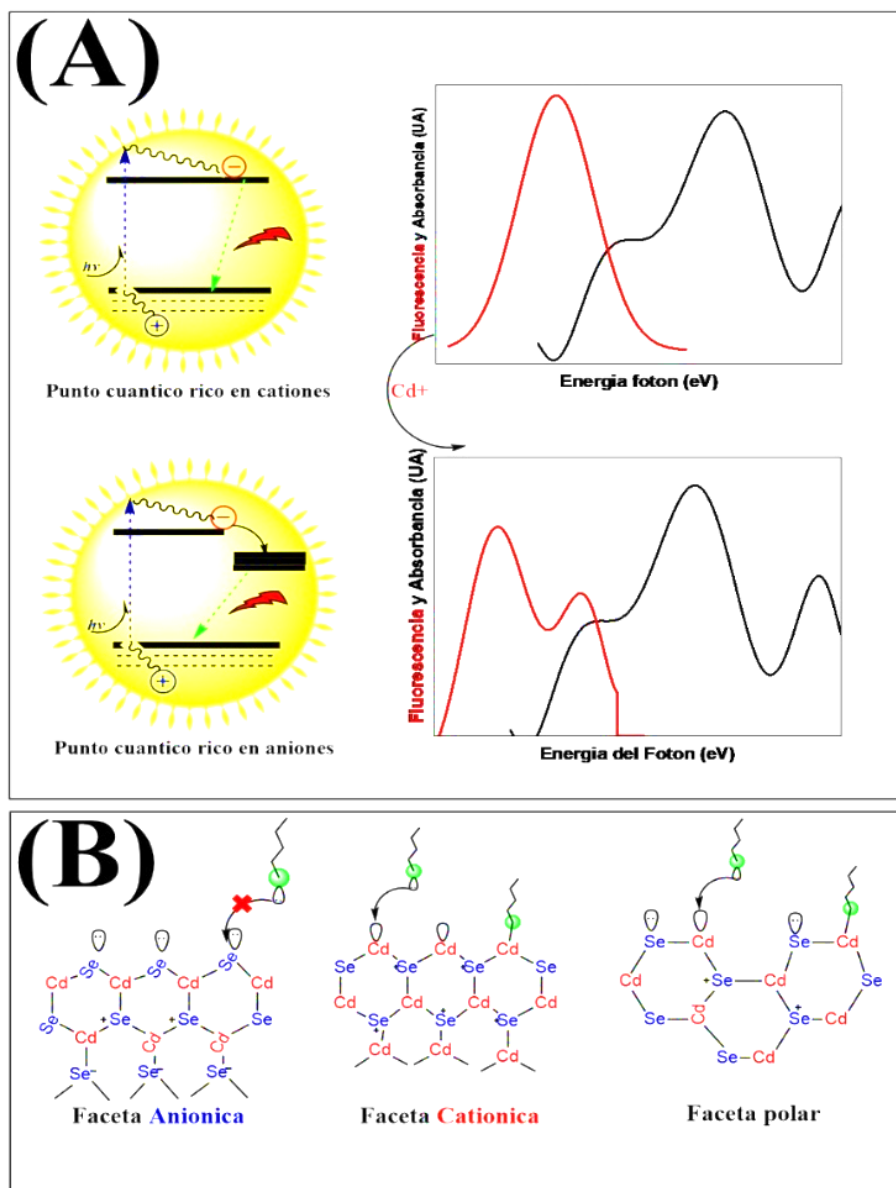
Lo anterior contrasta con los puntos cuánticos semiconductores de banda directa en las que ocurren transiciones de primer orden<sup>70</sup>. En el caso de los QD semiconductores con transición directa dominan los procesos de recombinación radiativa y, para el caso de los puntos cuánticos semiconductores de transición indirecta, los procesos prevalecientes son las denominadas transiciones no radiativas.

La emisión de luminiscencia depende directamente del tipo de transición que ocurre en el QD semiconductor. Existen tres tipos de procesos básicos de interacción entre los electrones del sólido y el campo de radiación: la absorción de fotones, la emisión espontánea y la emisión estimulada<sup>71</sup>. La fotoluminiscencia corresponde al proceso de emisión espontánea que tiene lugar en un sólido que ha sido excitado con fotones formando un par electrón - hueco. La adición de un agente de recubrimiento en la superficie del QD incrementa el tamaño hidrodinámico de este sin modificar el tamaño de su núcleo, lo que puede favorecer la formación de defectos de la superficie en la nanopartícula, los cuales puedan actuar como “trampas” temporales (de menor energía) para el electrón o el hueco, desfavoreciéndose así la recombinación electrón - hueco generando una débil fluorescencia desplazada hacia menores energías o una relajación no radiativa. Estas trampas pueden deberse a vacancias en la estructura cristalina, enlaces interrumpidos, moléculas adsorbidas en la superficie de la nanopartícula o la presencia de impurezas (Figura 4 (A)).

El efecto de los estados trampa superficiales es más pronunciado en QD que presentan una mayor banda prohibida, lo cual ocurre típicamente en aquellos de menor diámetro, debido al efecto de confinamiento cuántico. En estos nanocristales, la discretización de los niveles electrónicos genera una separación más amplia entre BV y la BC, aumentando así la probabilidad de que aparezcan niveles energéticos intermedios asociados a defectos superficiales o estados trampa. Además, la presencia de ligandos orgánicos o agentes de recubrimiento puede inducir o estabilizar defectos superficiales, dependiendo de su afinidad y cobertura, lo que contribuye a la formación de estos estados trampa (Figura 4 (A)).

La formación de los estados trampas, además, puede tener origen en la relación estequiométrica de los aniones y cationes que originan el QD semiconductor. Una mayor proporción de aniones en la red cristalina del QD disminuye la concentración superficial del catión y, como generalmente la interacción con el agente de recubrimiento ocurre con

el metal, se generan recubrimientos no homogéneos favoreciendo la generación de estados trampa (Figura 4 (A) inferior y (B)).



**Figura 4.** Efectos de las trampas superficiales en la emisión de fluorescencia de puntos cuánticos (A). Orbitales colgantes terminales en punto cuántico semiconductor, en este caso punto cuántico de CdSe (B).

Una mayor concentración de cationes en el QD sin embargo invierte este efecto; la base orgánica tendrá mayor posibilidad de formar enlaces con los átomos catiónicos formando así superficies de recubrimientos más homogéneas sin espaciados que disminuyan la intensidad de fluorescencia, permitiendo que la absorción de energía del QD y su transición energética entre las BV y BC sea directa, dando como resultado único pico de

emisión. Cuando la superficie consta de muchos estados trampa conduce a la extinción de la emisión de banda prohibida y la aparición de emisión a longitudes de onda mayores.

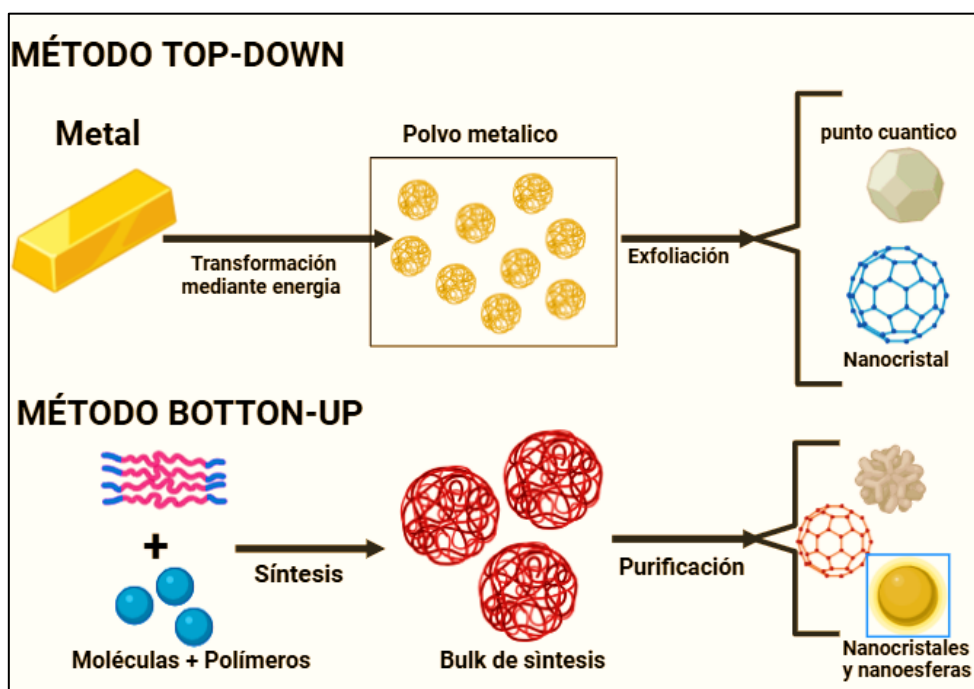
## **6.2. Síntesis de puntos cuánticos semiconductores**

El tamaño del QD semiconductor dependerá de la presencia y tipo del agente de recubrimiento, así como también de la síntesis empleada. Teniendo en cuenta este aspecto, el método de síntesis de los puntos cuánticos permitirá modular sus propiedades ópticas y electroquímicas.

El uso de un agente de recubrimiento permite controlar el crecimiento del QD y pasivar la superficie con el objeto de mejorar su estabilidad y solubilidad según el medio en el que se usará, así como las propiedades fotofísicas, fotoquímicas y electroquímicas. Por lo tanto, las propiedades ópticas como la intensidad de emisión, la eficiencia cuántica y la estabilidad fotoluminiscente, dependen en gran medida tanto del tipo como de la densidad superficial del recubrimiento. Ligandos mal anclados o con baja cobertura pueden dejar sitios superficiales expuestos, facilitando la formación de estados trampa que actúan como centros de recombinación no radiativa. En cambio, recubrimientos adecuados, como capas tipo core – shell o ligandos con alta afinidad, pueden pasivar eficazmente la superficie, suprimir estos defectos y mejorar la emisión óptica. La foto - oxidación del QD suele ser un problema relacionado a la pasivación de la superficie del QD, es por ello por lo que el uso de una capa inorgánica uniforme con una red cristalina que coincida con el núcleo del QD y que posee una banda prohibida más alta (por ejemplo, ZnS, ZnSe o CdS para el núcleo CdSe) suele ser una excelente alternativa a la hora de controlar este problema<sup>72</sup>.

Dentro de los métodos generales para sintetizar QD semiconductores se encuentran el método bottom - up (de abajo hacia arriba) y top - down (de arriba hacia abajo)<sup>73</sup>. En el primero, los precursores moleculares o iónicos de los QD reaccionan en solución para formar nanocristales. Por ejemplo, se obtienen QD en fase líquida se basa en la reacción de sales metálicas (NaHTe, NaHSe o sales de cadmio) en presencia de estabilizantes y del anión correspondiente, el que se agrega a partir de, generalmente, su sal (Na<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>Se, etc.), para dar QD estables tales como CdSe, CdTe, CdS, entre otros. Se puede realizar

tanto en medios acuosos como orgánicos. Comparativamente la reacción en medio acuoso resulta más económica, sencilla, obteniéndose puntos cuánticos de baja toxicidad, solubles en agua y estables<sup>74</sup>. En el segundo enfoque, los nanocristales de tamaños inferiores a 10 nm se obtienen a partir de la reducción de tamaño, litográfica o electroquímicamente, a partir de un sustrato macro semiconductor. La Figura 5 muestra los procesos de síntesis y formación de QD semiconductores.



**Figura 5.** Métodos de síntesis y obtención de puntos cuánticos.

Otro de los métodos de obtención de QD es la síntesis coloidal<sup>75</sup>. Cada una de las especies atómicas que formarán parte del QD se introduce en la mezcla en forma de un precursor, el cual es una molécula o un complejo que contiene una o más especies atómicas requeridas para el crecimiento de los QD. A este sistema líquido se lo conoce como soles. La descomposición de las especies atómicas trae como resultado la formación de nuevas especies reactivas (monómeros) que producirán la nucleación y el crecimiento de la nanopartícula. La efectividad del método radica en la presencia de una o más moléculas que actúen como agentes coordinantes que se adsorben de forma dinámica sobre la superficie del QD en crecimiento bajo las condiciones de reacción.

La elección del estabilizante varía de un caso a otro. Si este se une con demasiada fuerza a la superficie del QD impedirá su crecimiento y se obtendrán nanocristales pequeños. Si

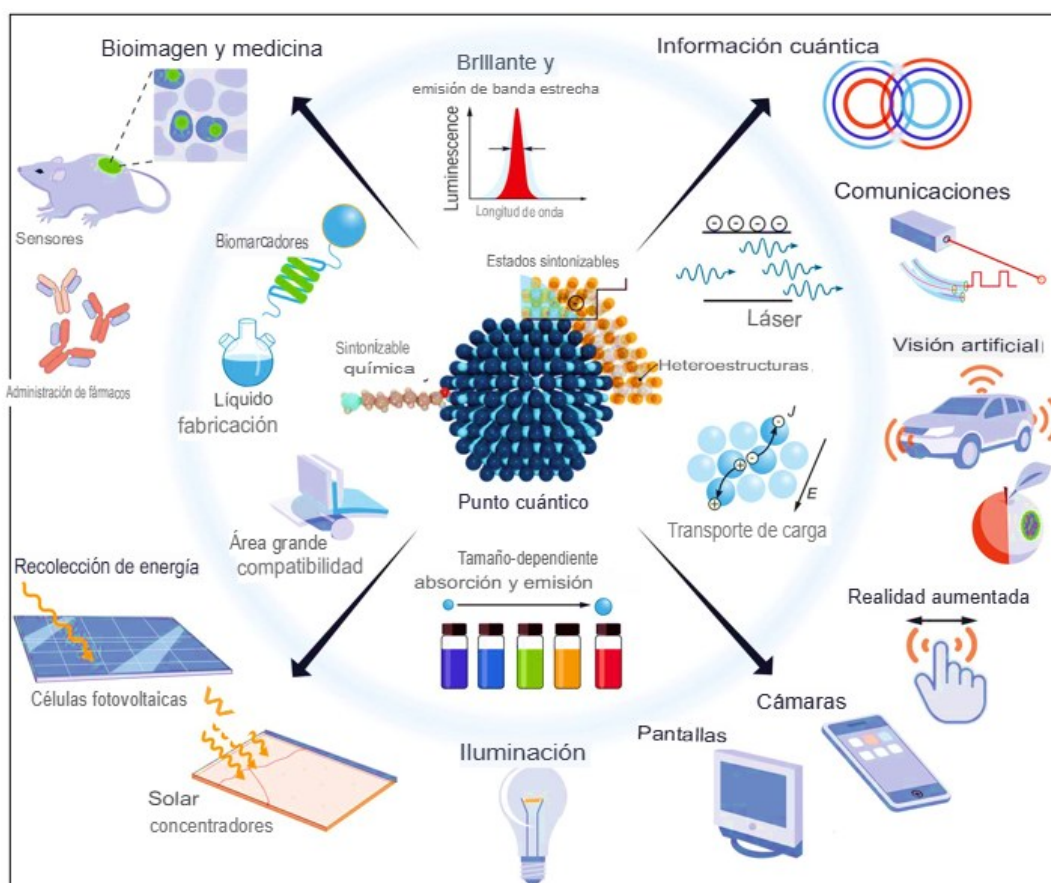
este agente coordinante se une de forma débil se consiguen nanopartículas con un gran tamaño o agregados. El agente de recubrimiento seleccionado debe tener alta afinidad por la superficie del QD, estabilidad coloidal a largo plazo en un amplio rango de pH y fuerza iónica, capacidad de bioconjugación y minimizar el tamaño hidrodinámico de la nanopartícula final como aspectos fundamentales.

### **6.3. Aplicaciones de los puntos cuánticos semiconductores**

Los QD semiconductores son aplicables a muchas disciplinas. Utilizados en sistemas biológicos como marcadores fluorescentes, en dispositivos fluorescentes y de imagen entre otros. Su alta demanda de aplicación es debido a la alta fluorescencia con emisión y absorción sintonizable<sup>76</sup>. Una de las mayores aplicaciones en la actualidad es en diversos campos del área biológica, incluyendo marcadores celulares, biosensores y en investigación biomédica, para el diagnóstico de enfermedades y en terapia fluorescente. Los QD semiconductores han logrado acoplarse con diferentes moléculas orgánicas como anticuerpos, proteínas, ADN, ácidos nucleicos, etc., permitiendo así su uso en biosensores electroquímicos y electroquimioluminiscentes.

Los QD semiconductores ofrecen una mejor alternativa que los fluoróforos convencionales (colorantes orgánicos) como marcadores biológicos ya que exhiben una fluorescencia continua por periodos de tiempo mayor que los colorantes orgánicos<sup>77</sup>. Otra ventaja que presentan los QD semiconductores es que pueden ser pasivados; un material envolvente y protector impide la interacción superficial con otras partículas logrando optimizar su eficiencia luminiscente.

Diversos tipos de biosensores han sido estudiados basados en procesos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) o en la agregación de pruebas fluorescentes para detectar analitos<sup>78</sup>. La Figura 6 muestra las principales aplicaciones de los puntos cuánticos semiconductores en la nanociencia y su uso en el campo del bioanálisis.



**Figura 6.** Aplicaciones de los puntos cuánticos en las nuevas tecnologías<sup>79</sup>.

## 7. Nitruro de carbono gráfico ( $g\text{-C}_3\text{N}_4$ )

Los avances en la nanociencia y la nanotecnología han llevado al uso y aplicación de diferentes nanomateriales, como en dispositivos electroquímicos y electroquimioluminiscentes, ya sea mediante la modificación de la superficie de electrodos y/o su utilización como elementos de marcado en los denominados sensores y/o biosensores<sup>80-83</sup>. Uno de los nanomateriales con importancia y aplicación en la nanociencia es el nitruro de carbono gráfico ( $g\text{-C}_3\text{N}_4$ ), un nanomaterial que pertenece a la familia de los materiales bidimensionales (2D), similar al grafeno, pero formado por átomos de carbono y nitrógeno. Es un nanomaterial semiconductor con una gran brecha energética entre sus BV y BC de aproximadamente 2,7 eV, debido a los planos gráficos conjugados formados por la hibridación  $sp^2$  de carbono y nitrógeno<sup>84</sup>. Dentro de las características favorables de este nanomaterial, se pueden considerar su estructura bidimensional ordenada y sintonizable, banda prohibida adecuada, alta estabilidad y,

además, se lo puede obtener de una manera muy simple. Es insoluble en medios polares, como el agua, presenta estabilidad química, y su estructura varía de acuerdo con su precursor. Algunas de las estructuras más comunes obtenidas en la síntesis de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se conocen como  $\alpha$ ,  $\beta$ , cúbica, pseudocúbica y grafitica, siendo esta última quizás la más conocida y utilizada en la actualidad<sup>85</sup>. La Tabla 1 describe cada una de las estructuras mencionadas y características principales, además de su distribución de formación.

**Tabla 1.** Estructuras comunes del nitruro de carbono a partir de su síntesis.

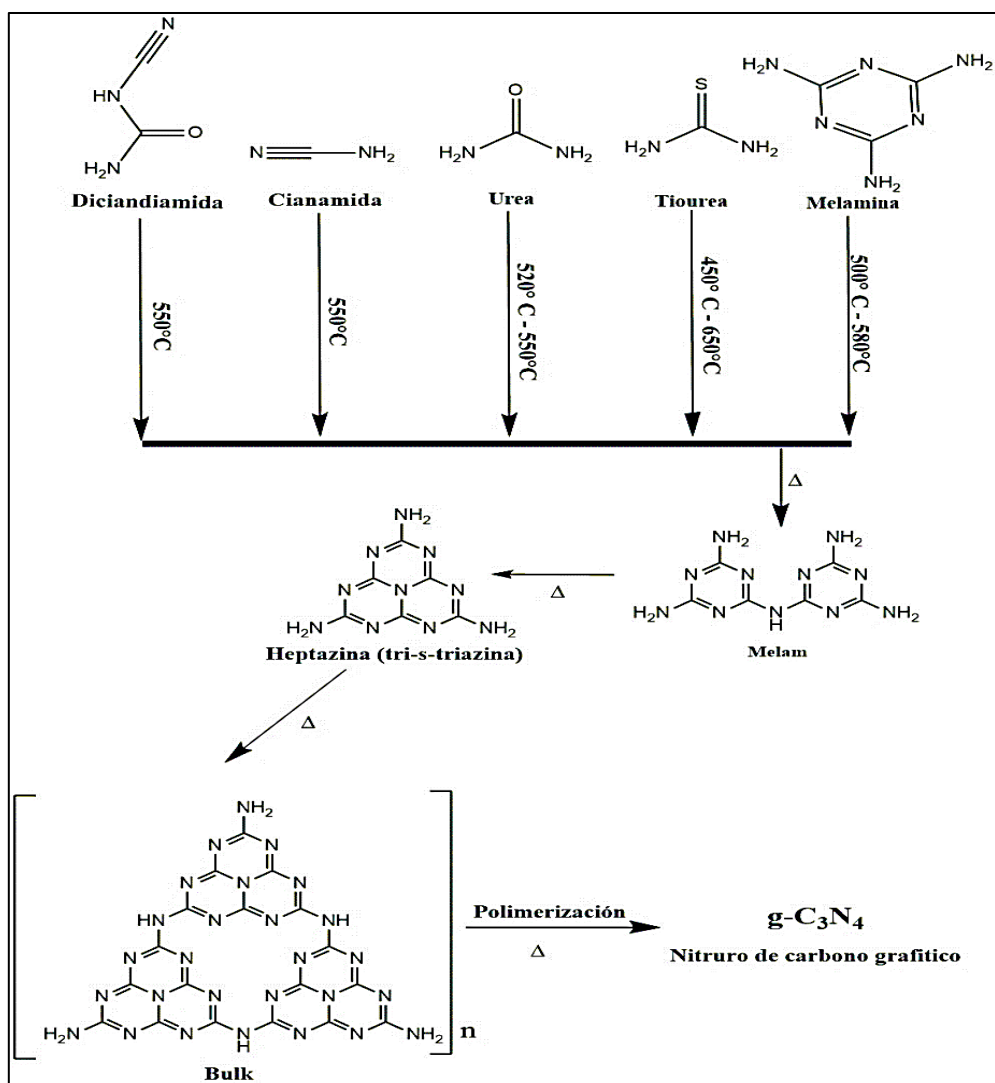
| Estructura        | Tipo de arreglo, Unidad básica             | Distribución                                                                                                          | Características                                                                                                  | Síntesis                                                                                                                     |
|-------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grafitica         | Apilamiento débil (2D), Heptazina          | Capas 2D con interacciones débiles entre ellas (Van der Waals); las capas son paralelas, pero poco cohesionadas.      | Baja cristalinidad, flexibilidad estructural, $E_g$ entre 2,7–2,9 eV, ideal para aplicaciones fotocatalíticas.   | Calcinación de precursores ricos en nitrógeno (melamina, urea, diciandiamida). 500–600 °C.                                   |
| Beta ( $\beta$ )  | Hexagonal menos compacta, Triazina         | Capas 2D más separadas (~3,4–3,8 Å) y con apilamiento desordenado; puede haber desplazamientos laterales entre capas. | Menor cristalinidad, más estados trampa electrónicos, mayor espaciado entre intercapas y defectos estructurales. | Calcinación controlada con condiciones específicas de presión y tiempo. 550–650 °C.                                          |
| Alfa ( $\alpha$ ) | Hexagonal compacta, Triazina               | Capas 2D con un apilamiento ordenado y uniforme, espaciado intercapas pequeño (~3,26 Å).                              | Alta cristalinidad, mayor estabilidad térmica, menor cantidad de defectos.                                       | Síntesis por calcinación a mayores presiones o tratamientos térmicos de $\beta$ -C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a 600–700 °C. |
| Pseudocúbica      | Red tridimensional distorsionada, Triazina | Similar a la cúbica, pero con ligeras distorsiones en la red cristalina, que introduce defectos estructurales.        | Propiedades intermedias entre la cúbica y grafitica; mayor flexibilidad estructural.                             | Tratamientos térmicos avanzados de precursores con atmósferas específicas a 700–800 °C.                                      |
| Cúbica            | Red tridimensional cúbica (3D), Triazina   | Estructura 3D, donde las unidades de triazina están conectadas covalentemente en una red cúbica regular.              | Alta densidad, simetría isotrópica; poco común y menos estudiada en comparación con las estructuras 2D.          | Condiciones extremas: altas temperaturas (>1000 °C) y presiones elevadas. >1000 °C                                           |

### 7.1. Síntesis de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Las estructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se obtienen a partir de unidades básicas formadas previamente durante el proceso de síntesis del nanomaterial. Así, dos de las unidades principales para la formación de las estructuras del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> son s-triazina y tri-s-triazina, también llamada heptazina. Muchos precursores ricos en nitrógeno y libres de metales, entre ellos urea<sup>86,87</sup>, tiourea<sup>88</sup>, cianamida<sup>89</sup>, diciandiamida<sup>90</sup> y melamina<sup>91</sup> se utilizan para sintetizar g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, comúnmente en su forma grafitica apilado en 2D. En la Tabla 1 se describe las síntesis para la obtención del nitruro de carbono grafitico.

Una manera de sintetizar el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en forma de nanomaterial laminar compuesto por unidades de triazina o heptazina en forma de estructura bidimensional, es mediante la calcinación térmica a partir de precursores ricos en nitrógeno como, por ejemplo, urea. Este proceso implica la polimerización y condensación de estas moléculas en condiciones controladas de temperatura y tiempo. De acuerdo con el precursor seleccionado, el mecanismo de síntesis puede variar, y si bien todos llevan a la formación de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, a un mayor tiempo de reacción y temperatura se pueden obtener las estructuras cristalinas complejas previamente mencionadas en la anterior tabla. La Figura 7 muestra el mecanismo de síntesis y formación del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a partir de diferentes precursores ricos en nitrógeno y carbono.

Durante la calcinación de urea a temperaturas de 520 - 550 °C, las moléculas se descomponen para formar amoníaco y cianamida. Posteriormente, la cianamida se polimeriza a estructuras basadas en triazina o heptazina. A medida que la temperatura aumenta, estas estructuras se ordenan en capas. Como producto final, se obtienen nanohojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> apiladas con porosidad moderada. Cuando se utiliza tiourea, el mecanismo de síntesis sigue un camino similar al de la urea, pero con liberación adicional de compuestos sulfurados, como sulfuro de hidrogeno. Este proceso genera defectos en la estructura del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> debido a la incorporación parcial de azufre, creando estados trampa. Como consecuencia, la presencia de azufre interfiere en la polimerización ordenada, y así las capas formadas tienen una mayor densidad de defectos. En este caso el producto final son nanohojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> apiladas con defectos inducidos por azufre, lo que ajusta sus propiedades electrónicas y ópticas.



**Figura 7.** Síntesis de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a partir de distintos precursores ricos en N y C. Cada precursor permite la formación de las nanolaminas bajo rangos de temperaturas específicas en el proceso de calcinación.

La melamina es un precursor triazínico que, al ser sometido a un tratamiento térmico entre 500 y 580 °C, experimenta un proceso de condensación térmica y polimerización. Durante esta etapa, se forman enlaces covalentes entre unidades de triazina, lo que da lugar a una red extendida de carbono y nitrógeno con una estructura laminar. Esta disposición da lugar a nanohojas de grafito de nitruro de carbono, caracterizadas por un apilamiento de capas con orden parcial y baja cristalinidad, aunque con elevada estabilidad térmica y una organización estructural suficiente para aplicaciones fotocatalíticas y electrónicas. Para el caso de la cianamida, esta se polimeriza a temperaturas de 400 - 550 °C, generando estructuras de heptazina como base. Estas

unidades se condensan y forman redes bidimensionales, organizándose en poliheptazina lineal que son cadenas iniciales que se reorganizan en estructuras laminares. El resultado de la síntesis a partir de cianamida son nanohojas de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  superpuestas con menor porosidad y mayor orden. La diciandiamida es un precursor rico en nitrógeno que genera cianamida al calentarse a temperaturas de 500 - 600 °C, la cual una vez formada se polimeriza y se condensa en redes de heptazina. Estas a su vez polimerizan por medio de enlaces covalentes para dar, finalmente, una estructura laminar bien definida, resultado de la polimerización controlada.

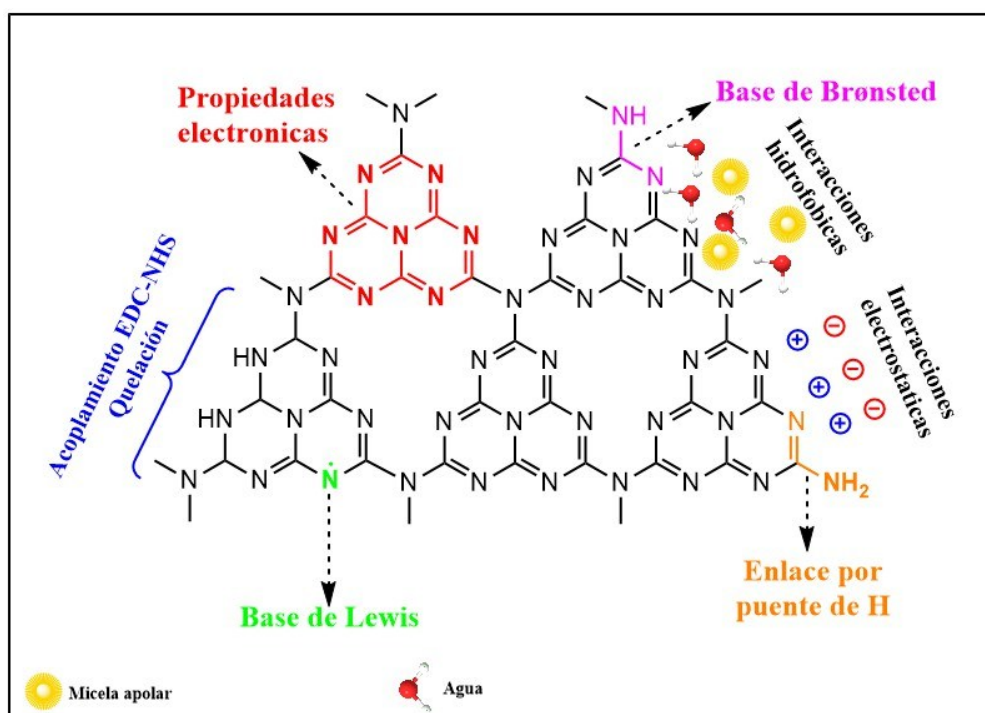
## **7.2. Funcionalidades superficiales del $\text{g-C}_3\text{N}_4$**

El  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  es un material altamente versátil y funcional gracias a su estructura rica en átomos de nitrógeno, enlaces conjugados y diferentes tipos de sitios activos que permiten una variedad de interacciones químicas y aplicaciones. Es un material cuya estructura y composición lo convierten en una plataforma ideal para el diseño de una amplia gama de aplicaciones químicas, electrónicas y biológicas. Sus propiedades intrínsecas, combinadas con su capacidad de ser modificado químicamente, lo posicionan como un material clave en la nanociencia y la nanotecnología. El  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  es un material que puede interactuar con otras moléculas o especies químicas mediante diversos mecanismos, lo que lo convierte en un atractivo candidato para el desarrollo de biosensores<sup>92</sup>. A continuación, se presenta una descripción integrada de sus características y capacidades funcionales:

- I. Interacciones hidrofóbicas: los anillos conjugados en la estructura del  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  permiten la interacción con moléculas orgánicas no polares a través de interacciones hidrofóbicas, lo que resulta útil en aplicaciones de separación y adsorción<sup>93</sup>.
- II. Interacciones electrostáticas: los sitios cargados del  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , especialmente aquellos con carga positiva asociada a los nitrógenos protonados a pH bajos, pueden atraer aniones o interactuar con moléculas cargadas negativamente.
- III. Quelación: los pares de electrones libres en los átomos de nitrógeno actúan como bases de Lewis, coordinándose con metales de transición para formar complejos metálicos estables<sup>94,95</sup>.

- IV. Acoplamiento EDC-NHS: la presencia de grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) en el  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  permite reacciones de funcionalización química, como el acoplamiento carbodiimida (EDC) y N-succinimida (NHS), que son fundamentales para aplicaciones biológicas, como la inmovilización de biomoléculas<sup>96,97</sup>.

La Figura 8 representa las propiedades funcionales de la superficie del  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ .



**Figura 8.** Estructura de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  con sus posibles alternativas de interacción con el medio.

Además, el  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  presenta varias propiedades clave que amplían su funcionalidad:

- I. **Propiedades electrónicas:** su estructura basada en anillos de triazina o heptazina genera sistemas conjugados de electrones  $\pi$  que facilitan procesos de transferencia electrónica. Esto lo hace ideal para aplicaciones en fotocatalisis, sensores semiconductores y almacenamiento de energía<sup>98</sup>.
- II. **Funciones de base de Lewis:** los átomos de nitrógeno con pares de electrones libres no enlazados son sitios activos capaces de coordinarse con cationes metálicos, lo que mejora su capacidad catalítica<sup>99</sup>.
- III. **Funciones de base de Brønsted:** algunos grupos amina y nitrógenos en la estructura pueden actuar como donadores de protones en reacciones ácido - base, modulando la actividad catalítica del material<sup>100</sup>.

- IV. Enlace por puente de hidrógeno: los grupos amina ( $-\text{NH}_2$ ) pueden formar enlaces puente de hidrógeno con moléculas o iones, estabilizando estructuras y facilitando interacciones químicas específicas, especialmente en ambientes acuosos<sup>101</sup>.

## **8. Procesos de emisión de luminiscencia: principios y fundamentos**

La emisión de luz es un fenómeno fundamental en la naturaleza y la tecnología. Este fenómeno se manifiesta en diversos contextos, desde procesos naturales como la bioluminiscencia en organismos vivos, hasta aplicaciones tecnológicas avanzadas en sensores, pantallas y dispositivos de iluminación<sup>102</sup>. La luminiscencia se caracteriza por la emisión de luz a bajas temperaturas y ocurre debido a procesos electrónicos que involucran estados excitados en átomos, moléculas o materiales. La luminiscencia incluye varios subtipos como la quimioluminiscencia, la fotoluminiscencia, y la EQL, cada uno definido por el mecanismo por el cual se generan los estados excitados<sup>103</sup>.

### **Quimioluminiscencia (QL)**

Se define como la emisión de radiación electromagnética originada a partir de una reacción química, la cual produce un intermediario o producto excitado electrónicamente que, al volver a su estado fundamental, libera energía en forma de luz<sup>104</sup>. El uso de la quimioluminiscencia como técnica analítica tiene una serie de ventajas que incluyen especificidad y simplicidad, además de instrumentación económica. Estas ventajas permiten su aplicación en biosensores. Los biosensores quimioluminiscentes muestran límites de detección (LD) muy bajos (incluso hasta el nivel de fentomol) y un amplio intervalo dinámico de trabajo en varios órdenes de magnitud<sup>105</sup>.

### **Fotoluminiscencia (FL)**

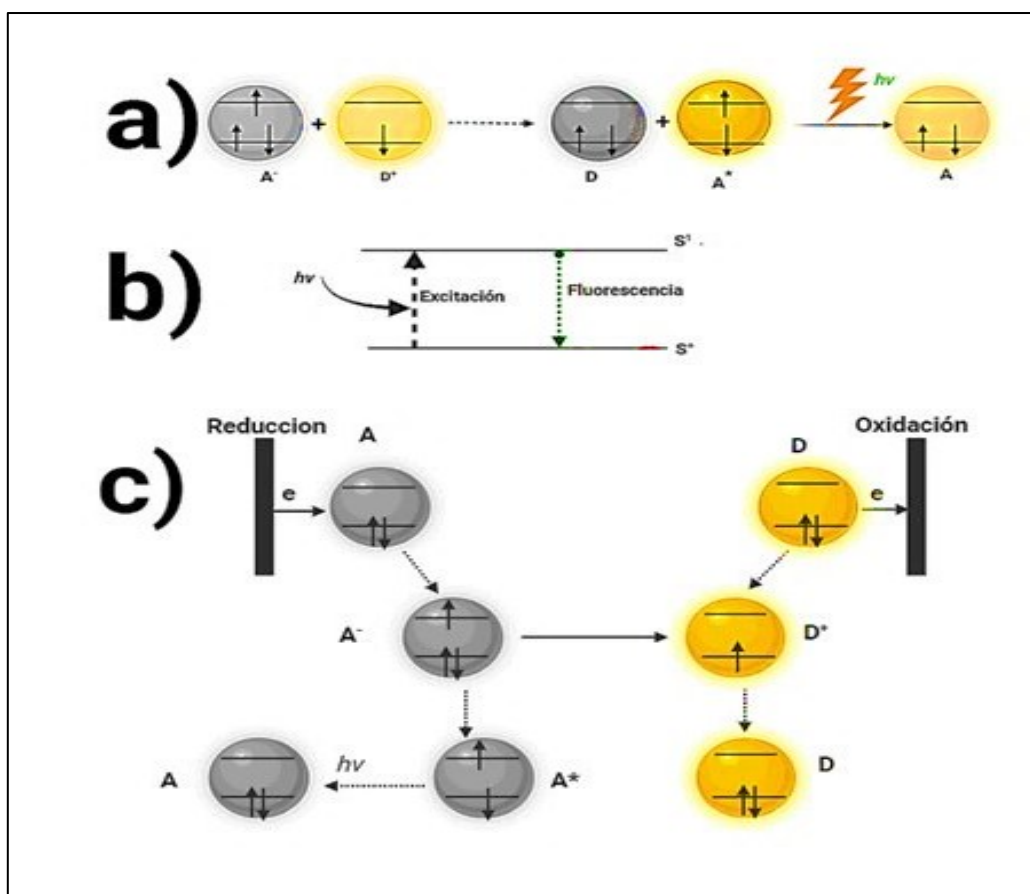
En este proceso la emisión de luz es producto de la excitación previa de una molécula o partícula a través de la irradiación de una fuente de luz. La luz emitida se debe a la liberación de energía cuando el electrón vuelve de un estado excitado al nivel fundamental. Cuando una partícula (o molécula) absorbe fotones provenientes de una

fuentes de luz, genera un salto electrónico del electrón desde un nivel energético de la banda HOMO (en nanomateriales se habla de BV), hacia un nivel de energía superior de la banda LUMO (BC en nanomateriales). Al ocurrir este salto se genera, en moléculas una especie excitada, y en nanopartículas la formación de un par  $h^+ - e^-$ , donde, en ambos casos, al regresar a su estado fundamental liberan energía en forma de luz<sup>106</sup>. Este proceso se denomina fluorescencia.

#### Electroquimioluminiscencia (EQL)

La EQL o quimioluminiscencia electrogenerada, (abreviada EQL por sus siglas en español), es el proceso en el cual las especies generadas sobre electrodos a partir de reacciones heterogéneas experimentan posteriores reacciones de transferencia de electrones que dan origen a especies con estados excitados que emiten luz<sup>107</sup>. La emisión de EQL ocurre en la parte visible del espectro como consecuencia de reacciones de transferencia de electrones rápidas y altamente exoenergéticas entre un dador de electrones o huecos, y un aceptor de huecos o electrones, dando lugar a la formación de un par  $h^+ - e^-$ <sup>108</sup>. La luminiscencia producida en EQL se inicia y se controla alterando el potencial de un electrodo.

La EQL es un proceso el cual requiere de reacciones heterogéneas (es decir, sobre la superficie del electrodo) y homogéneas (en solución), por lo que necesita de condiciones específicas. Sin embargo, es una técnica que presenta una respuesta selectiva y, por lo tanto, de gran aplicación en sistemas analíticos de detección. En el proceso de EQL la reacción electroquímica permite controlar el tiempo y los perfiles difusionales de las especies responsables de la emisión de luz<sup>109</sup>. Además, la EQL es más selectiva que la QL, debido a que las generaciones de estados excitados pueden controlarse selectivamente cambiando los potenciales aplicados a los electrodos. Por otra parte, la EQL es una técnica no destructiva en algunos casos, porque algunos de los emisores de luz pueden regenerarse después de la emisión de EQL<sup>110</sup>. La Figura 9 representa los tres tipos de luminiscencia mencionados anteriormente.



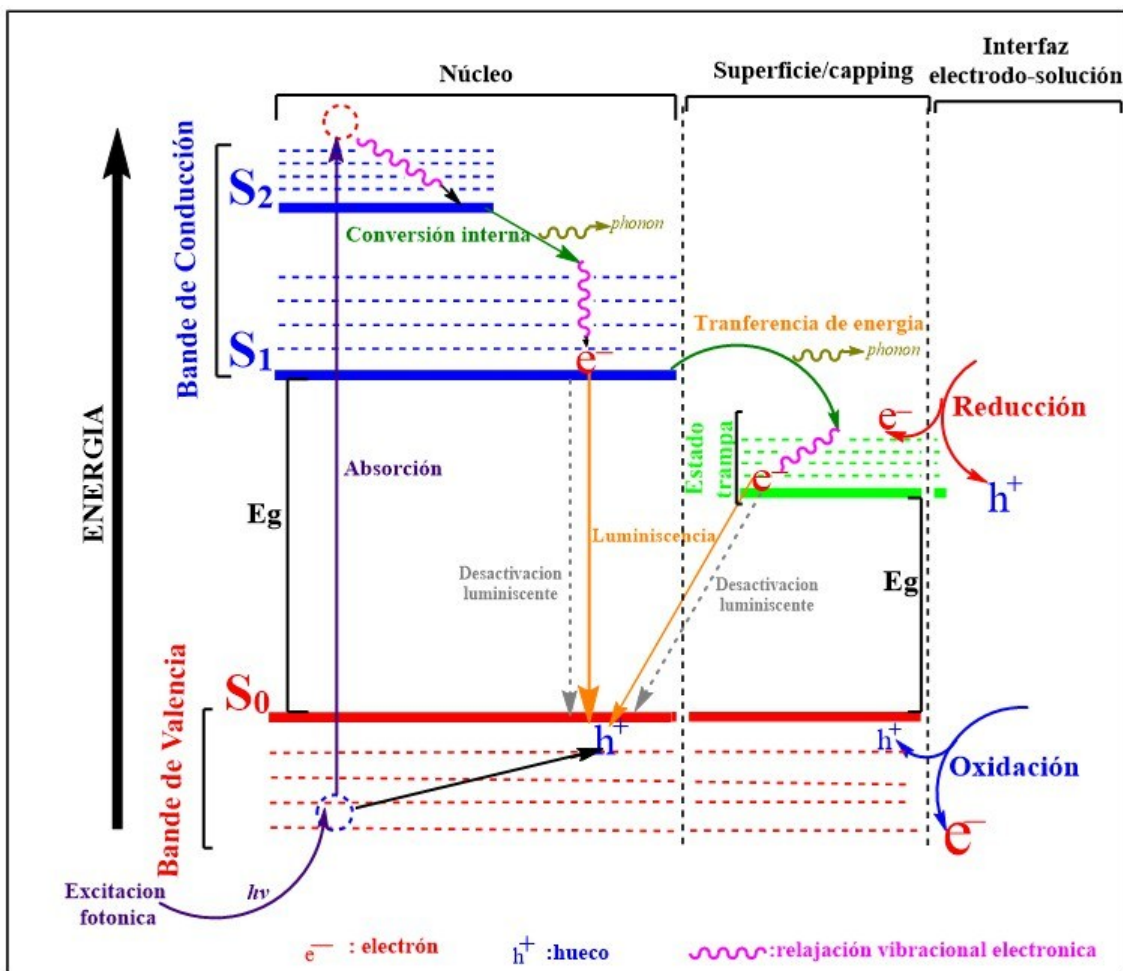
**Figura 9.** Mecanismos de generación de luminiscencia: quimioluminiscencia (a); fotoluminiscencia (b) y; electroquimioluminiscencia (c). A y D hacen referencia al aceptor y dador de electrones, respectivamente.

### 8.1. Generación de los estados excitados de nanopartículas: transiciones radiativas y no radiativas

Cualquier proceso con una respuesta de emisión luminiscente requiere una previa excitación de la nanopartícula. Esta excitación puede producirse mediante dos métodos principales: excitación óptica o excitación redox. En la excitación óptica, la nanopartícula absorbe un fotón de energía suficiente para promover el salto de un electrón desde el nivel de energía superior en la BV al nivel de energía más bajo desocupado de la BC, generando el par  $h^+ - e^-$ , o excitón, generalmente en la región del espectro comprendida entre el ultravioleta al infrarrojo<sup>111,112</sup>. Por otro lado, en la excitación redox, reacciones electroquímicas donde una especie se oxida y otra especie se reduce, inducen la formación

de especies excitadas capaces de emitir luz. Estas reacciones redox pueden ser en fase homogénea o heterogénea<sup>113</sup>.

En la Figura 10 se representan las posibles transiciones y vías de generación luminiscente de un nanomaterial semiconductor fotoexcitado y electro excitado, así como también los procesos en su núcleo y su superficie<sup>114</sup>.



**Figura 10.** Diagrama de Jablonsky para un nanomaterial semiconductor y sus posibles procesos radiativos y no radiativos mediante perturbación fotónica y excitación redox. Las líneas onduladas y discontinuas representan las transiciones no radiativas y pérdidas energéticas; las líneas continuas representan los procesos involucrados en las transiciones radiativas. Se indican los procesos que ocurre en el núcleo y la superficie, además de los procesos electroquímicos en la interfaz electrodo - solución.

En detalle, al irradiarse un nanomaterial, este puede absorber la suficiente energía para excitar los electrones presentes en los niveles energéticos de la BV, desplazándolos al borde energético de la misma banda. Este borde energético de banda es denominado estado fundamental ( $S_0$ ) siendo el nivel de mayor energía en la BV<sup>115</sup>. Si el electrón cuenta con la suficiente energía para realizar un salto energético, podrá ocupar un nivel disponible de la BC del nanomaterial. A este proceso se le conoce como absorción<sup>116</sup>. Después de ocurrido el proceso de absorción, los electrones promovidos a un nivel de la BC pierden energía debido a su desplazamiento a niveles energéticos dentro de la misma BC. Este proceso de relajación electrónica a niveles inferiores dentro de la BC es un proceso no radiativo que libera energía en forma de vibraciones (fonones) estabilizando el electrón en un nivel excitado más bajo. A este proceso se le conoce como conversión interna<sup>117</sup>.

Los nanomateriales, especialmente nanoláminas y puntos cuánticos, poseen una gran cantidad de trampas electrónicas, con un nivel de energía localizado dentro de la banda prohibida que atrapa portadores de carga. Cuando los electrones o huecos quedan atrapados en estos estados, el exceso de energía se puede liberar a través de procesos no radiativos<sup>118</sup>. Aunque no es un proceso de transferencia de energía clásica, el salto al estado trampa puede involucrar una transferencia local de energía dentro del material: la energía del electrón en el nivel excitado es cedida al sistema, típicamente como energía vibracional en la red cristalina (interacción electrón - fonón)<sup>119</sup>. Esto lo diferencia de una transferencia de energía en sentido químico, como cuando un material transfiere energía excitada a otra molécula cercana.

El proceso de emisión de luminiscencia ocurre cuando un electrón excitado que se encuentra en el borde de la BC regresa a su estado fundamental en la BV, emitiendo un fotón. Este proceso es característico por ser rápido (en la escala de unos pocos nanosegundos)<sup>120</sup>. Por otro lado, la emisión luminiscente desde un estado trampa al estado fundamental ocurre cuando un electrón atrapado en un nivel energético intermedio se recombina con un hueco presente en la BV. Este proceso suele generar una emisión de menor energía, originando un corrimiento batocrómico debido a la naturaleza más baja del estado trampa en comparación con la emisión desde el borde inferior de energía de la BC, y puede ser más lento dependiendo de la profundidad del estado trampa y de las dinámicas de relajación<sup>121,122</sup>.

Además de los procesos que involucran la emisión de fotones, puede ocurrir la combinación de  $e^-$  y  $h^+$  con emisión no radiativa. Este proceso involucra la transferencia de energía al entorno, generalmente como calor, denominado desactivación no radiativa y compite con la emisión radiativa, disminuyendo la eficiencia luminiscente<sup>123</sup>.

En sistemas electroquímicos, las reacciones de oxidación y reducción heterogéneas funcionan como herramientas para excitar electrónicamente la nanopartícula, reemplazando la excitación fotónica convencional<sup>124</sup>. En un proceso de oxidación, un electrón es extraído desde la BV de la nanopartícula hacia el electrodo dejando un hueco. El proceso de reducción por ocurre mediante la inyección directa de electrones desde el electrodo a su BC, o indirectamente a través de especies radicalarias que generan intermediarios redox capaces de transferir electrones en el nivel vacante de menor energía de la BC o estados trampa, dependiendo del potencial aplicado y de la estructura electrónica de la nanopartícula. Este proceso de formación de pares  $h^+ - e^-$ , permite la generación de procesos radiativos de luminiscencia<sup>125</sup>. A diferencia de la excitación producida por foto - inducción, la excitación producida por reacciones heterogéneas es mayormente superficial y está limitada por la accesibilidad de los niveles de energía superficiales al electrodo. Sin embargo, en ciertos casos, la conductividad interna del nanomaterial puede permitir una transferencia más profunda si la nanopartícula es suficientemente conductora y carente de estados trampa.

## **8.2. Procesos de desactivación de la luminiscencia**

Las técnicas basadas en la emisión de luz de moléculas y/o nanopartículas son las más utilizadas como técnicas de detección en biosensores, debido a la facilidad de detección de la respuesta luminiscente y a su alta sensibilidad. Como se ha mencionado, la luminiscencia de las nanopartículas semiconductoras es muy sensible al estado de su superficie, por lo que cualquier interacción física y química entre una especie y el entorno que rodea a la nanopartícula, podría provocar cambios en la eficiencia de la recombinación del par  $h^+ - e^-$ . En tal sentido, las respuestas de los sensores/biosensores pueden ser debido a un incremento o una disminución de la luminiscencia en función con la concentración del analito.

La disminución de la luminiscencia se denomina desactivación o quenching, y se refiere al proceso por el cual ocurre una disminución de la intensidad de la luz emitida. Muchas interacciones moleculares producen este fenómeno; entre ellas, se encuentran las reacciones del estado excitado, reordenamiento molecular, transferencia de energía o de electrones, formación de complejos en el estado fundamental, formación de excímeros y exciplejos y desactivación por colisiones<sup>126</sup>. Estos procesos pueden ser internos (dentro de la misma molécula o nanopartícula) o externos (debido a interacciones con otras especies o superficies).

Tanto en la fluorescencia<sup>127</sup> como la EQL<sup>128</sup> puede ocurrir procesos de desactivación o quenching de la luminiscencia. Este fenómeno puede ser causado, como se mencionó anteriormente, por factores como transferencia de energía, transferencia de electrones, formación de complejos no emisores, interacciones con el medio o defectos de superficie<sup>129</sup>. Se distinguen dos tipos de quenching estático y dinámico son dos mecanismos que explican la disminución luminiscente propia de los procesos de fluorescencia. Ambos procesos tienen características distintas y operan bajo condiciones específicas.

El modo estático<sup>130</sup> ocurre debido a la formación de un complejo no fluorescente entre la especie emisora de luz y la especie extintora de la misma en el estado fundamental. La constante de desactivación de la fluorescencia es independiente del tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau$ ). Se describe como:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q] \quad (4)$$

donde  $K_S$  es la constante de asociación y  $[Q]$  es la concentración de la especie extintora de la fluorescencia. El valor de  $K_S$  está relacionado con las concentraciones de las especies involucradas en el proceso, lo cual se puede representar mediante la Ecuación:



el complejo FQ absorbe energía, pero no emite fluorescencia, contribuyendo a las transiciones no radiativas. La fluorescencia disminuye con la formación del complejo, pero el tiempo de vida del fluoróforo no cambia. El modo dinámico<sup>131</sup> ocurre por colisiones entre el fluoróforo en el estado excitado y la especie extintora de la luz, resultando en la desactivación no radiativa. Este modo de apagamiento depende de las

interacciones que ocurren durante el tiempo de vida del fluoróforo excitado. El análisis del este proceso se puede realizar mediante la ecuación de Stern- Volmer<sup>132</sup>:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0^1 [Q] \quad (6)$$

el termino  $\frac{I_0}{I}$  es el cociente entre la intensidad de emisión luminiscente en ausencia del quencher y en presencia de este,  $k_q \tau_0^1$  hace referencia a la constante de Stern-Volmer ( $K_D$ , por su abreviación en ingles de constante dinámica). Tanto la fluorescencia como el tiempo de vida disminuyen proporcionalmente, así el apagamiento de la fluorescencia de modo dinámico aumenta con la temperatura, ya que las colisiones son más frecuentes a mayor energía térmica.

En EQL, la desactivación de la luminiscencia puede ocurrir por diversas especies presentes en el sistema que interfieren con los procesos radiativos de las especies excitadas generadas durante el proceso electroquímico<sup>133</sup>. Muchas veces, la desactivación de la EQL es causado por moléculas redox que, al reaccionar con las especies oxidadas o reducidas electroquímicamente, desactivan su energía en lugar de permitir que reaccionen y emitan luz. Ejemplos comunes son el oxígeno molecular, que captura electrones y puede formar radicales que son eficientes extintores de la EQL. Las especies peróxido también juegan un papel importante en algunos sistemas, ya que reaccionan con los estados excitados para reducir la eficiencia luminiscente<sup>134</sup>.

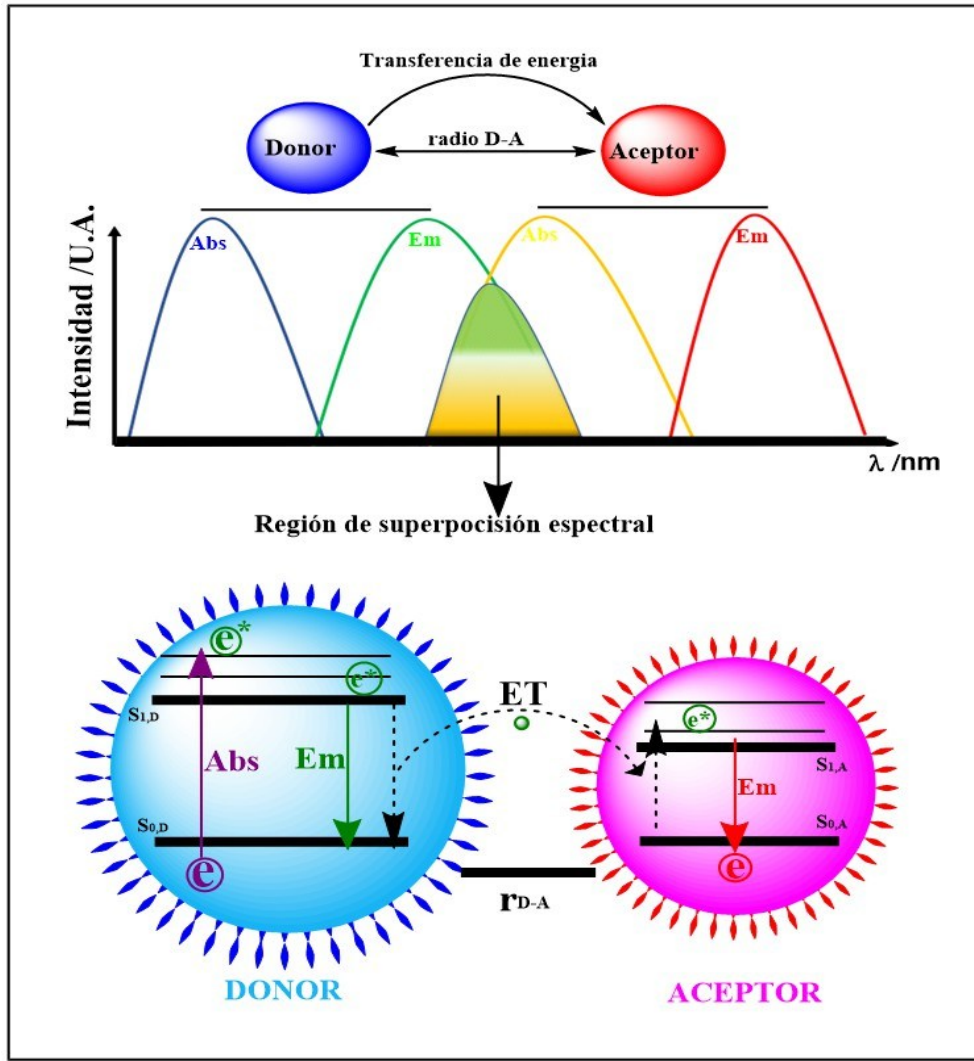
Además de moléculas con propiedades redox, los iones metálicos, como los de cobre o plata, pueden actuar como extintores de la EQL al formar complejos con las especies excitadas, evitando la emisión de luz. Estos metales pueden facilitar la transferencia de electrones hacia el sustrato o hacia otras especies que desactivan el sistema excitado<sup>135</sup>. Por último, los defectos superficiales en los electrodos, especialmente en materiales como el grafeno o óxido de grafeno, también pueden ser extintores eficaces de la EQL. Estos defectos pueden interactuar con las especies excitadas, causando una relajación de su energía de manera no radiativa, lo que reduce la intensidad de la señal luminiscente<sup>136</sup>.

### 8.3. Transferencia de energía

Uno de los principales procesos de desactivación de la fluorescencia que generalmente está involucrado en la mayoría de las aplicaciones analíticas es la transferencia de energía por resonancia (RET). La transferencia de energía es un proceso fotofísico en el cual una molécula o partícula (especie dadora), en su estado excitado, se desactiva regresando al estado fundamental mediante la transferencia de energía a otra molécula o partícula cercana (especie aceptora)<sup>137</sup>. Puede ocurrir a través de un mecanismo radiativo o no radiativo. La forma radiativa, involucra la emisión del dador (D) seguido por la subsecuente absorción de dicho fotón por parte del aceptor (A). Este proceso no requiere de un encuentro físico entre D\* y A, pero si es dependiente del solapamiento del espectro de emisión del D y de absorción del A. En el proceso de transferencia de energía no radiativo, no se involucra la emisión de un fotón, sino que se requiere de interacciones entre D y A durante el tiempo de vida del D en su estado excitado. Puede ocurrir mediante dos mecanismos:

- (i) Transferencia de energía de resonancia por la interacción dipolo – dipolo o mecanismo de Förster (FRET), se basa en un acoplamiento coulombico a través de un campo eléctrico oscilante y es de largo alcance entre D y A ( $\leq 8\text{-}10\text{ nm}$ ). Es necesario que exista un solapamiento espectral adecuado entre la emisión del dador y la absorción del aceptor.
- (ii) Transferencia de energía de resonancia por intercambio electrónico o mecanismo de Dexter, requiere un solapamiento espacial de los orbitales moleculares del donor y el aceptor y, por lo tanto, solo ocurre a distancias muy cortas ( $\leq 1,5\text{ nm}$ ).

Como se muestra en la Figura 11, existe una región de superposición del espectro de emisión del dador y el de absorción del aceptor (región de superposición espectral,  $J(\lambda)$ ). Este solapamiento es una condición necesaria para que ocurra el proceso de transferencia de energía. Como se ha mencionado para que ocurra un mecanismo tipo FRET, a través del acoplamiento dipolo - dipolo de largo alcance, el dador de energía se debe encontrar a una distancia de entre 80 y 100 Å del aceptor, siendo esta distancia el denominado radio de Förster<sup>138</sup>. La constante de velocidad del mecanismo FRET depende de varios factores, como son la distancia relativa dador - aceptor, la orientación de los momentos dipolares y el coeficiente de absorción molar del aceptor.



**Figura 11.** Mecanismo transferencia de energía tipo Förster (FRET) entre dos nanomateriales luminiscentes.

La eficiencia de transferencia de energía ( $E_{ET}$ ) está definida por la siguiente ecuación:

$$E_{ET} = 1 - \frac{I_{D-A}}{I_D} \quad (7)$$

donde  $I_{D-A}$  es la integración de la curva de emisión del dador en presencia del aceptor e  $I_D$  es la integración de la emisión del dador en ausencia del aceptor. El radio de Förster ( $R_0$ ) para el par dador-aceptor se calcula utilizando la Ecuación (8) y se define como la distancia a la que RET tiene una eficiencia del 50 %.

$$R_0 = 9,70 \times 10^3 [k^2 \eta^4 \phi_D J(\lambda)]^{1/6} \quad (8)$$

donde  $k^2$  describe la orientación de los dipolos y puede variar en valor desde 0 (perpendicular) a 4 (colineal/paralelo),  $\eta^4$  es el índice de refracción del disolvente,  $\phi_D$  es el rendimiento cuántico del dador, y  $J(\lambda)$  el valor de la integral de superposición espectral, la cual se determina con la Ecuación (9):

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} \quad (9)$$

donde  $F_D(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia normalizada del dador,  $\epsilon_A(\lambda)$  es el coeficiente de extinción del aceptor a la longitud de onda  $\lambda$ .

El proceso de transferencia de energía entre sistemas de nanopartículas semiconductoras es muy utilizado a la hora de diseñar biosensores de afinidad, como son los inmunosensores. De manera similar, en las reacciones electroquimioluminiscentes, también ocurren procesos RET, donde las especies excitadas se generan electroquímicamente y pueden transferir electrones o huecos a otras moléculas, las que actúan como emisoras de luz.

#### 8.4. Procesos electroquímicos en nanopartículas semiconductoras

Una reacción electroquímica es un proceso químico heterogéneo que implica la transferencia de electrones entre un nanomaterial semiconductor y el electrodo, en medio de un conductor iónico (solución electrolítica)<sup>139</sup>. Las reacciones que ocurren en el electrodo puede ser procesos anódicos o catódicos, las cuales hacen referencia al proceso de oxidación, cuando un nanomaterial transfiere electrones al electrodo, y reducción cuando un nanomaterial gana electrones provenientes del electrodo.

Una manera de medir la velocidad de las reacciones es analizar la variación de la carga en función de un del tiempo, es decir, la corriente<sup>140</sup>. La corriente  $i$  es una medida conveniente de la velocidad de la reacción global la cual se relación con la carga de los procesos redox involucrados en un intervalo finito de tiempo. La carga necesaria para convertir  $m$  moles de material en una reacción del electrodo que implica la transferencia de  $n$  electrones por molécula está determinada por la ley de Faraday<sup>141</sup>.

Para la siguiente reacción de transferencia de electrones



la corriente faradaica puede escribirse como:

$$\frac{i}{nFA} = \frac{j}{nF} [k_R c_R(0) - k_O c_O(0)] \quad (11)$$

siendo  $j$  la densidad de corriente. Las concentraciones que intervienen en la expresión de la velocidad son las existentes en la superficie del electrodo, es decir en  $x = 0$ , mientras que  $k_R$  y  $k_O$  son las constantes de velocidad características de los dos procesos de reducción y oxidación respectivamente.

A un tiempo inicial bajo condiciones de equilibrio, en donde la corriente faradaica es nula, las concentraciones en el electrodo de las especies R y O son iguales a su valor en la solución, por lo que:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (12)$$

donde  $C_O$  y  $C_R$  son las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas, respectivamente,  $E^0$  representa el potencial estándar del electrodo<sup>142</sup>,  $R$  la constante universal de los gases,  $T$  la temperatura y  $F$  la constante de Faraday. Esta ecuación, denominada ecuación de Nernst<sup>143</sup>, describe el potencial de equilibrio de un electrodo para una reacción redox en función de las concentraciones de las especies implicadas. La ecuación de Nernst se puede relacionar directamente con el potencial estándar de una reacción redox al describir cómo el potencial de electrodo para una reacción varía con las concentraciones de las especies redox presentes en la solución.

Este potencial representa la energía necesaria para agregar o quitar un electrón; representado como:

$$E_{rxn} = E^0 \left( D^{\circ+} / D \right) - E^0 \left( A / A^{\circ-} \right) \quad (13)$$

donde  $E_{rxn}$  es el potencial estándar redox de la reacción de transferencia electrónica;  $E^0 \left( D^{\circ+} / D \right)$  es el potencial estándar de la especie oxidada, y  $E^0 \left( A / A^{\circ-} \right)$  es el potencial estándar de la especie reducida. El potencial estándar está directamente relacionado con

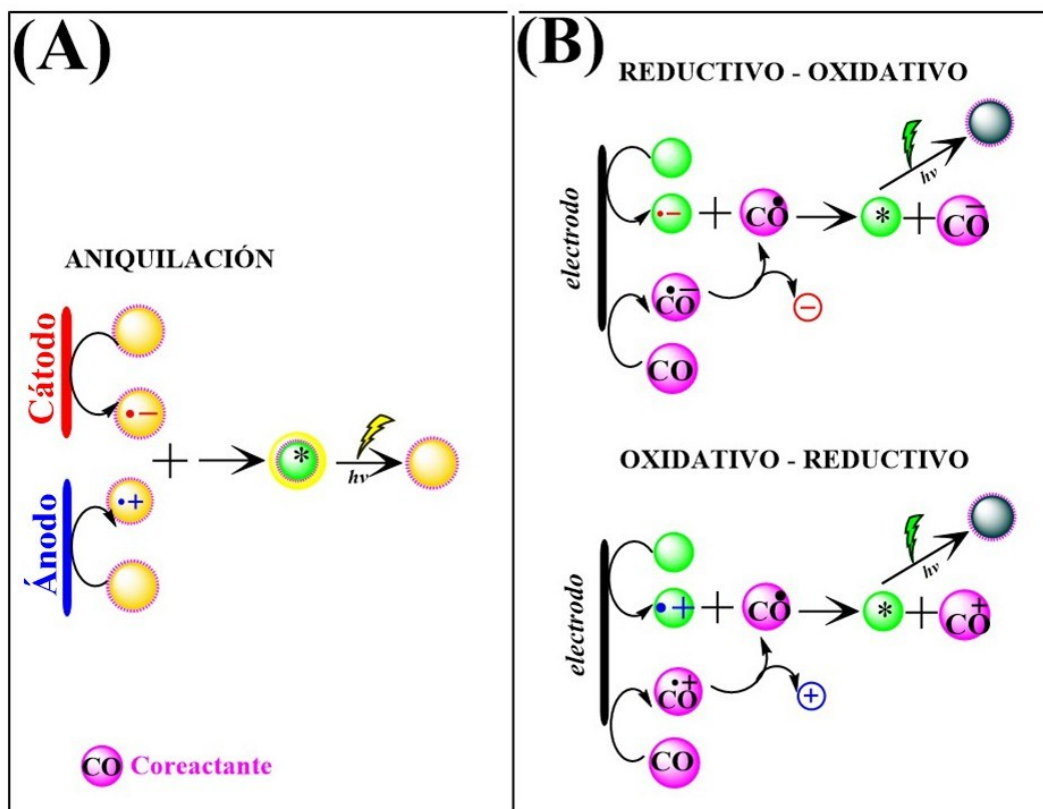
la energía libre de Gibbs estándar ( $\Delta G^\circ$ )<sup>144</sup> de una reacción redox, que es una medida de la espontaneidad de la reacción. Esta relación se expresa mediante la ecuación:

$$\Delta G^\circ = -nFE_{\text{rxn}} \quad (14)$$

Donde  $E^\circ_{\text{rxn}}$  es el potencial estándar de la reacción global. De esta manera queda vinculada la energía libre con el potencial de la celda.

## 9. Generación de la electroquimioluminiscencia

Los procesos que dan lugar a la EQL pueden ser a través de la vía de aniquilación o por la vía del coreactante. La Figura 12 describe las vías de generación del proceso de EQL.



**Figura 12.** Mecanismos de generación de la EQL vía de aniquilación (A); vía coreactante (B) reductivo - oxidativo (arriba) y oxidativo - reductivo (abajo).

Por ambas vías se generan especies excitadas las que darán lugar a la emisión de luz<sup>145</sup>. En los procesos de aniquilación de los QD, estos se oxidan y reducen electroquímicamente, difunden, se encuentran y reaccionan<sup>146</sup>. El catión y el anión radical del QD se aniquilan para formar el estado excitado del nanomaterial. En la vía del coreactante, se requiere de un reactivo auxiliar llamado coreactante (por ejemplo, ion oxalato, peroxidisulfato, tripropilamina, etc.)<sup>147</sup>. En el barrido de potencial, tanto los QD como el coreactante sufren una transferencia de carga heterogénea para, luego, reaccionar entre sí y emitir luz. La EQL por la vía del coreactante se puede clasificar en procesos anódicos (reducción oxidativa) y catódicos (oxidación reductora), según sea la polaridad del potencial aplicado y el papel del coreactante como reductor u oxidante (Figura 12).

Tanto los procesos por la vía de la aniquilación como por la del coreactante tienen varias ventajas y siguen caminos separados para generar el estado excitado electrónicamente que eventualmente emite luz. Sin embargo, todos los mecanismos de involucran especies químicas generadas electroquímicamente<sup>145</sup>.

### 9.1. Cinética de la electroquimioluminiscencia

Uno de los elementos más importantes para tener en cuenta en la generación de radiación electroquimioluminiscente es la cinética de la reacción homogénea. Por ello, la energía de la reacción de transferencia de electrones, si es suficiente, conduce a la producción de estados excitados. La energía con la cual se puede generar las especies oxidadas y/o reducidas se relaciona a las variables termodinámicas a partir de los potenciales estándar de oxidación y reducción. Así, el estado singlete excitado se puede describir en términos termodinámicos con la siguiente ecuación:

$$-\Delta H^0 = E_{\text{oxid}}^0(D^{+\bullet}, D) - E_{\text{red}}^0(A, A^{-\bullet}) - T\Delta S^0 \quad (15)$$

donde  $E_{\text{oxid}}^0$  y  $E_{\text{red}}^0$  son los potenciales estándar de oxidación y reducción de las especies dadora (D) y aceptora (A), respectivamente, y  $\Delta S^0$  la variación de entropía estándar para el proceso de EQL. Considerando que el término  $T\Delta S^0$  equivale aproximadamente a 0,16 eV en condiciones estándar<sup>148</sup>, siendo este un aporte energético de poca consideración, la mayor energía impulsora del mecanismo radica en los potenciales estándar redox ( $E^0$ ),

tanto de la especie dadora como de la aceptora, los que se pueden vincular con la variación estándar de energía libre de Gibbs como:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E^0 = -nF(E_{\text{oxid}}^0 - E_{\text{red}}^0) \quad (16)$$

Por lo que

$$\Delta H^0 = -nF\Delta E^0 + 0,16 \text{ eV} \quad (17)$$

El proceso fundamental en la EQL es la generación de luz a partir de la formación electroquímica de iones radicales, por lo que es muy importante los potenciales redox estándar y la estabilidad de estos iones radicales. Por lo tanto, son necesarios algunos requisitos previos para los compuestos que exhiben emisión luminiscente generada electroquímicamente.

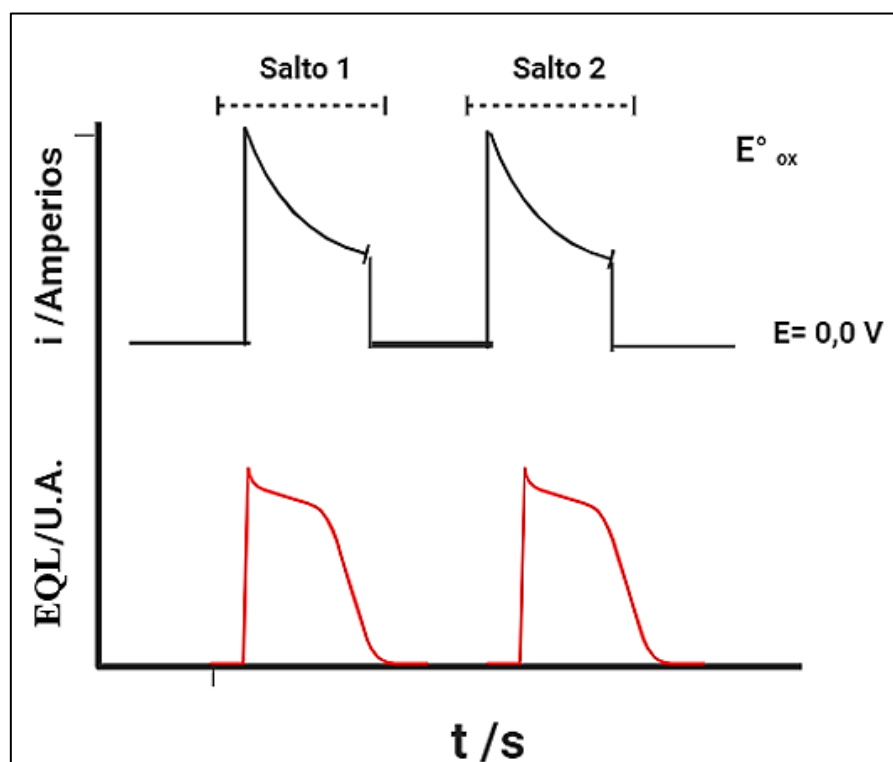
En primer lugar, los compuestos luminiscentes deben tener un gran sistema de electrones  $\pi$  deslocalizados que permita la formación reversible de cationes y/o aniones radicales. Dichos compuestos deben tener baja energía singlete y triplete. El segundo requisito es un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia.

La formación de los iones radicales ocurre en los electrodos, y la emisión de luz se producirá al encontrarse los radicales formados generando especies excitadas que serán las responsables de la emisión, por lo que el proceso es controlado por la difusión de las especies radicales formadas en las superficies de los electrodos. Este mecanismo puede modificarse al inmovilizar uno de los compuestos o nanoestructuras sobre la superficie del electrodo, en donde el proceso de EQL dependerá del encuentro entre los radicales inmovilizados y los que se producen en la superficie del electrodo o en su cercanía.

## 9.2. Cuantificación de la señal electroquimioluminiscente

Uno de los métodos de generación de la señal de EQL es a través de la cronoamperometría de múltiples pulsos de potencial<sup>149</sup>, en la cual se somete el sistema sucesivos saltos de potencial, aplicando un potencial igual o superior al potencial de oxidación o reducción de las especies intervinientes.

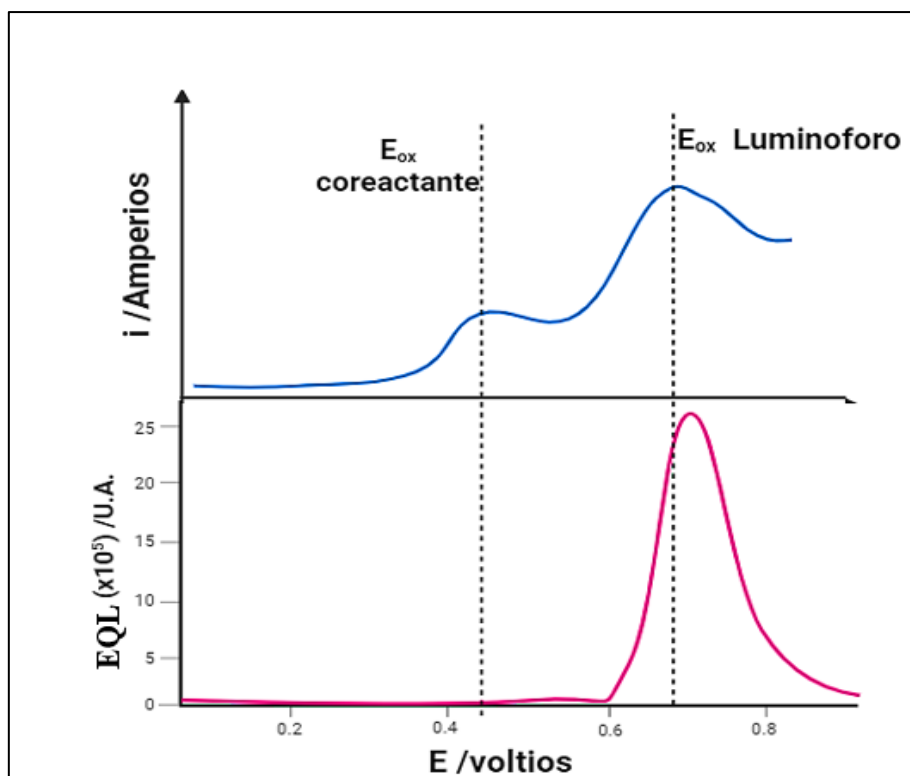
Primero se aplica un potencial en donde no ocurren procesos faradaicos, es decir, no hay reacción electroquímica, el cual es generalmente el potencial de equilibrio ( $E_{eq}$ ). Luego, se impone un valor de potencial tal que la reacción heterogénea ocurra <sup>149</sup>. El pulso se mantiene por un tiempo determinado obteniendo un transiente corriente vs. tiempo <sup>150,151</sup>. Luego de un tiempo determinado se impone otro valor de potencial en el cual el proceso redox no ocurre. Este proceso puede realizarse en múltiples ciclos. Esta metodología, generalmente, se utiliza para determinar la estabilidad del proceso de EQL con respecto al tiempo y analizar la cinética de transferencia electrónica del sistema. La Figura 13 representa la respuesta electroquimioluminiscente de un sistema sometido a dos saltos anódicos de potencial.



**Figura 13.** Medición de la EQL mediante la cronoamperometría de salto múltiple.

También, la respuesta EQL puede determinarse a partir de un barrido de potencial usando voltamperometría lineal o cíclica, en donde se aplica un barrido de potencial a una velocidad determinada desde un potencial inicial (generalmente el potencial de equilibrio) hasta un potencial en donde ocurre una reacción de oxidación y/o reducción de las especies participantes. Estas mediciones permiten determinar los potenciales de oxidación y/o reducción, expresados como potenciales de pico anódico ( $E_{p,a}$ ) y catódico ( $E_{p,c}$ ), identificando los requerimientos energéticos para la generación de radicales

responsables de la emisión de luz. La Figura 14 describe una experiencia de voltamperometría lineal y la respuesta EQL en función de los potenciales de oxidación de la especie emisora de luz y el coreactante.



**Figura 14.** EQL en función de los potenciales de oxidación del coreactante y el luminóforo.

A partir de la Figura 14 se puede inferir que para que ocurra la excitación de la especie emisora es necesario la formación de radicales provenientes del coreactante, los que darán lugar a la formación de la especie excitada encargada de la emisión. El rendimiento cuántico EQL puede ser cuantificado a partir de la comparación con una molécula de referencia (moléculas o partículas con rendimientos cuánticos de emisión conocidos y estandarizados, por ejemplo, complejos de rutenio, luminol, entre otros). La cuantificación de la señal electroquimioluminiscente se realiza a partir del rendimiento cuántico EQL ( $\Phi_{\text{EQL}}$ ). Esta eficiencia es igual al número de fotones emitidos dividido por la corriente del proceso redox de las especies reactantes, tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\text{EQL}} = \Phi_{\text{ref}} \times \frac{\int_0^t I_{\text{EQL}} dt}{Q} \times \frac{Q_{\text{ref}}}{\int_0^t I_{\text{EQL}_{\text{ref}}} dt} \quad (18)$$

donde  $Q$  hace referencia a la carga expresada en A·s,  $I_{\text{EQL}}$  (expresado en unidades arbitrarias, así como también en Einstein/s) es la intensidad de EQL emitida por el luminóforo, la cual se expresa en función del área bajo la curva calculada experimentalmente; el subíndice *ref* hace referencia a un luminóforo estándar, cuyos valores son previamente determinados, con la finalidad de comparar la emisión de la muestra en estudio.

### 9.3. Coreactantes

Los coreactantes son sustancias químicas que participan en las reacciones de EQL facilitando y/o mejorando la generación de especies excitadas responsables de la emisión de luz. Los coreactantes pueden ayudar a superar la ventana de potencial limitada de un solvente o estabilizar los aniones o cationes de nanopartículas, lo que mejora sustancialmente la intensidad de EQL<sup>152</sup>. El coreactante se puede oxidar o reducir para dar lugar a cationes o aniones radicales intermedios los que, a partir de reacciones posteriores, originar una especie reductora u oxidante poderosa, las que reaccionan con las especies luminóforas proporcionando electrones o huecos para completar los procesos de excitación<sup>153</sup>. Los coreactantes utilizados se pueden dividir en dos tipos: coreactantes EQL R – O (reductivo - oxidativo) y coreactantes EQL O – R (oxidativo - reductivo)<sup>154</sup>. Los coreactantes típicos se enumeran en la Tabla 2.

Para seleccionar el coreactante apropiado para la EQL de nanopartículas como puntos cuánticos semiconductores, se deben tener en cuenta los niveles de energía relativos de los puntos cuánticos y del coreactante a partir del análisis de los potenciales de oxidación y reducción.

**Tabla 2.** Coreactantes típicos utilizados para la EQL de nanopartículas y sus correspondientes reacciones.

| Coreactante                                       | Tipo                 | Reacción Principal                                                                            |
|---------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Persulfato <sup>155</sup> ( $S_2O_8^{2-}$ )       | Catódico             | $S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{\bullet-} + SO_4^{2-}$                                   |
| Sulfito <sup>156</sup> ( $SO_3^{2-}$ )            | Anódico              | $SO_3^{2-} \rightarrow SO_3^{\bullet-} + e^-$                                                 |
| Carbonato <sup>157</sup> ( $CO_3^{2-}$ )          | Anódico              | $CO_3^{2-} \rightarrow CO_3^{\bullet-} + e^-$                                                 |
| Peróxido de hidrógeno <sup>158</sup> ( $H_2O_2$ ) | Catódico             | $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^{\bullet}$                                                |
| Oxígeno <sup>159</sup> ( $O_2$ )                  | Anódico              | $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$                                                        |
| Piruvato ( $CH_3COCOO^-$ )                        | Catódico             | $CH_3COCOO^- + e^- \rightarrow$<br>$CH_3COCOO^{\bullet-} \rightarrow CH_3CO^{\bullet} + CO_2$ |
| Aminas <sup>160</sup> (TPrA, TEA)                 | Anódico              | $R_3N \rightarrow R_3N^{\bullet+} \rightarrow R_3N^{\bullet} + H^+$                           |
| ITO <sup>161</sup> + $O_2$                        | Anódico/<br>Catódico | $In/SnO_x \rightarrow In/SnO_x^{\bullet-} + O_2 \rightarrow$<br>$In/SnO_x + O_2^{\bullet-}$   |

## 10. Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que convierten una respuesta biológica en una señal eléctrica; estos dispositivos deben ser específicos, en lo posible independientes de parámetros físicos como el pH y la temperatura del medio en el que se encuentren. Como característica principal, constan de un componente biológico como enzimas, anticuerpos o células, sobre un transductor físico o químico que convierte una interacción o reacción biológica en una señal medible, como una corriente eléctrica, una emisión de luz y una variación de masa. Estos dispositivos se utilizan ampliamente en campos como la medicina, la biotecnología, y el control ambiental, entre otros<sup>162</sup>.

Los biosensores se han clasificado según varias perspectivas; sin embargo, la clasificación más comúnmente utilizada se basa en dos factores: el elemento de reconocimiento de origen biológico y la transducción de la señal. En el primer caso, la biomolécula determina la especificidad, sensibilidad y aplicación del biosensor. A continuación, se detallan los principales tipos:

- I. Biosensores enzimáticos: para estos biosensores se utilizan enzimas como elementos de bioreconocimiento. Las enzimas catalizan reacciones específicas, lo que permite detectar el analito mediante cambios en la concentración del sustrato enzimático, productos formados o cofactores. Su alta especificidad y cinética rápida los hacen ideales para aplicaciones como la detección de glucosa, lactato y colesterol. Dentro de este grupo se destacan los sensores de glucosa basados en glucosa oxidasa, que generan peróxido de hidrógeno o consumo de oxígeno, lo que da lugar a alternativas de detección tanto ópticas como eléctricas<sup>163,164</sup>.
- II. Inmunosensores: este tipo de biosensores emplean anticuerpos como elementos de bioreconocimiento para detectar moléculas específicas mediante interacciones inmunológicas altamente específicas. Estas interacciones dan origen a señales detectables mediante métodos ópticos, electroquímicos o piezoeléctricos. Se usan principalmente en diagnóstico clínico, detección de enfermedades y control de calidad alimentaria<sup>165</sup>.
- III. Genosensores: estos biosensores utilizan secuencias específicas de ADN o ARN (oligonucleótidos) como elementos de reconocimiento para detectar secuencias complementarias (ácidos nucleicos) mediante la hibridación. Son ampliamente utilizados en diagnósticos moleculares, análisis genéticos y estudios de mutaciones<sup>166</sup>.
- IV. Biosensores basados en aptámeros: también denominados aptasensores. Utilizan aptámeros, que son cadenas de ADN o ARN seleccionadas in vitro con alta afinidad y especificidad hacia el analito. Estos biosensores son versátiles, estables y útiles en la detección de pequeñas moléculas, proteínas o células enteras. Dentro de este grupo de biosensores, se destacan los sensores de aptámeros para detección de contaminantes como pesticidas en agua<sup>167</sup>.

Los biosensores también se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo que utilizan para convertir la interacción biológica en una señal detectable. Este componente,

conocido como transductor, determina el tipo de señal producida (eléctrica, óptica, mecánica, etc.). A continuación, se describen los principales tipos:

- I. Biosensores electroquímicos: estos biosensores generan señales eléctricas como respuesta a reacciones químicas, generalmente redox, ocurridas entre el analito y el receptor biológico<sup>168</sup>. Se clasifican en dos tipos principales:
  - A. Potenciométricos: miden el cambio en el potencial eléctrico generado en un electrodo de trabajo en condiciones de equilibrio químico.
  - B. Amperométricos: miden corrientes eléctricas generadas por reacciones redox inducidas por el analito. Son muy utilizados para medir la glucosa en sangre.
- II. Biosensores ópticos: estos biosensores detectan cambios en propiedades ópticas como la intensidad, la longitud de onda, la polarización o la fase de la luz debido a interacciones con el analito<sup>169</sup>. Dentro de este grupo se encuentran:
  - A. Espectrofotométricos: basados en la absorción o emisión de luz.
  - B. Interferométricos: miden cambios en la interferencia de la luz debido a la adsorción de biomoléculas en una superficie.
  - C. Plasmónicos (SPR): utilizan la resonancia de plasmones superficiales para detectar cambios en el índice de refracción de un medio cerca de una superficie metálica<sup>170</sup>.
- III. Biosensores piezoeléctricos: basados en cristales piezoeléctricos, estos biosensores detectan cambios en masa o propiedades mecánicas en la superficie del transductor al interactuar con el analito. Algunos de estos biosensores como la microbalanza de cristal de cuarzo, mide variaciones en la frecuencia de oscilación de un cristal de cuarzo debido a la adsorción de biomoléculas<sup>171</sup>.
- IV. Biosensores de luminiscencia: basados en la emisión de luz como resultado de reacciones químicas, biológicas o electroquímicas.
  - A. Quimioluminiscentes: detectan luz generada por reacciones químicas específicas<sup>172</sup>.
  - B. Electroquimioluminiscentes (EQL): combinan reacciones electroquímicas con emisión de luz en electrodos, ideales para sistemas de baja concentración de analitos<sup>173</sup>.

## **10.1. Diseño y ensamble de biosensores**

El principio de funcionamiento de un biosensor radica en convertir y transducir el proceso biológico en forma de señal eléctrica, óptica u otra señal física detectable. Por lo que la selección de materiales y la inmovilización de la biomolécula es crucial para el funcionamiento adecuado del biosensor.

### **10.1.1. Materiales para el electrodo o el sustrato de soporte del biosensor**

Los electrodos proporcionan una plataforma conductora, y los sustratos proporcionan una plataforma estable, para la interacción entre el analito y el elemento de bioreconocimiento. Estos materiales deben ser químicamente estables, conductores y capaces de soportar modificaciones superficiales. Cuando se habla de electrodos, el oro, el platino y el carbono vítreo son ampliamente utilizados debido a su alta conductividad y estabilidad electroquímica<sup>174</sup>. Como un método de mejorar la superficie en términos de conductividad, estabilidad y aumento del área del electrodo, nanoestructuras de carbono como los nanotubos de carbono y el grafeno, óxidos metálicos (TiO<sub>2</sub>, ZnO), las nanopartículas de oro, entre otras, mejoran la superficie activa y la transferencia de electrones<sup>175,176</sup>. El uso de estos materiales ha hecho posible la preparación de superficies electródicas nanoestructuradas<sup>177</sup> con nuevas e interesantes propiedades. Las superficies nanoestructuradas abren nuevas alternativas para la inmovilización de biomoléculas de manera estable.

El sustrato de soporte de un biosensor es el material sobre el cual se deposita el componente biológico sensible, como una enzima, anticuerpo, célula o cualquier otra biomolécula. Este sustrato proporciona una superficie estable y adecuada para la inmovilización del biocomponente y para garantizar una interacción eficiente con el analito<sup>178</sup>. Además, el sustrato de soporte debe ser compatible con el transductor que convertirá la señal bioquímica en una señal medible. Se emplean polímeros como poliimidas, vidrios o cerámicas como soporte, asegurando resistencia mecánica y flexibilidad para el ensamblaje. La Tabla 3 muestra los materiales comúnmente utilizados en el diseño y ensamblaje de biosensores, así como también la descripción y aplicación de estos.

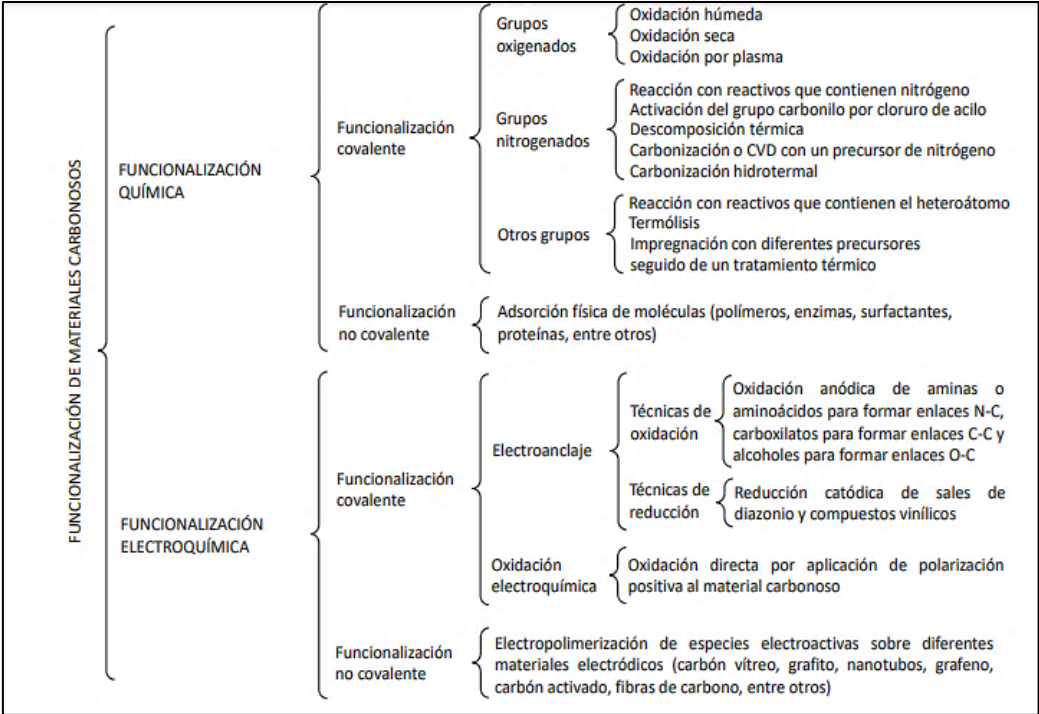
**Tabla 3.** Tipos de materiales comunes en el diseño y ensamble de biosensores.

| Tipo de material                            | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ref |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Materiales conductores y semiconductores    | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Electrodos de carbono: utilizados por su alta conductividad y facilidad de funcionalización.</li> <li>-Oro y platino: materiales nobles, estables y biocompatibles.</li> <li>-Puntos cuánticos: emisión de luz eficiente, útiles en EQL, fotoluminiscencia y procesos de oxido-reducción.</li> <li>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: alta conductividad y estabilidad electroquímica. Excelentes emisores de fluorescencia.</li> </ul> | 179 |
| Materiales poliméricos                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Polímeros conductores: mejoran la transducción de señales.</li> <li>-Polímeros biocompatibles: mejoran la estabilidad y biocompatibilidad.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                               | 180 |
| Nanomateriales                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Nanotubos de carbono: alta conductividad, superficie y densidad de grupos funcionales.</li> <li>-Nanopartículas metálicas: sensibilidad mejorada, electrocatálisis.</li> <li>-Nanofibras: alta área superficial.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                         | 181 |
| Materiales biomiméticos                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Anticuerpos y aptámeros: elementos de reconocimiento biomolecular.</li> <li>-Antígenos y proteínas: interacción con anticuerpos.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 182 |
| Materiales supramoleculares                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ciclodextrinas: formación de complejos con moléculas.</li> <li>-Polímeros supramoleculares: para la transducción de señales.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 183 |
| Materiales basados en biocompatibilidad     | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Silicio: usado en biosensores integrados.</li> <li>-Hidrogel: usado para inmovilizar biomoléculas.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 184 |
| Materiales para modificación de superficies | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Grupos químicos: para la funcionalización de electrodos y captura de biomoléculas.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |

Un sensor debe optimizar la interacción entre el analito de estudio y la superficie del electrodo, ya que a través de esta interacción se busca conseguir una comunicación óptima entre ambos componentes. Estas modificaciones de los electrodos con nanoestructuras mejoran las propiedades electroanalíticas básicas, como son la sensibilidad y la selectividad de los métodos, y la repetibilidad de las medidas.

Existe hoy día una amplia variedad de materiales adecuados para modificación de superficies de electrodos<sup>185</sup>. Dentro de las ventajas que ofrece la modificación de superficies electródicas con nanomateriales podemos destacar el hecho que la superficie generada puede funcionar como catalizador de la reacción electroquímica, disminuyendo el sobrepotencial necesario para que tenga lugar la reacción heterogénea y favoreciendo la reversibilidad del proceso<sup>186</sup>. Además, debido a su elevada área superficial, pueden proporcionar un aumento en la señal<sup>187,188</sup>. El uso de electrodos serigrafiados de carbono y de carbono vítreo, debido a su naturaleza carbonosa, permiten con facilidad y eficiencia la modificación o generación de grupos funcionales en su superficie.

Existen diversos métodos de modificación de superficies carbonosas. En la Figura 15 se presenta un breve esquema de las técnicas más frecuentes empleadas para la funcionalización de superficies compuestas por materiales carbonosos<sup>189</sup>.



**Figura 15.** Esquema de las técnicas para la funcionalización de materiales carbonosos.

Como se observa en la Figura 15, las vías de funcionalización de superficies electródicas carbonosas, ya sea por la vía química o electroquímica, permiten la formación de grupos funcionales capaces de asegurar una interacción entre un analito y la superficie. Además, puede permitir la inmovilización de un elemento de reconocimiento (por ejemplo, una biomolécula) en una superficie modificada por un nanomaterial conductor, para dar lugar a un biosensor electroquímico.

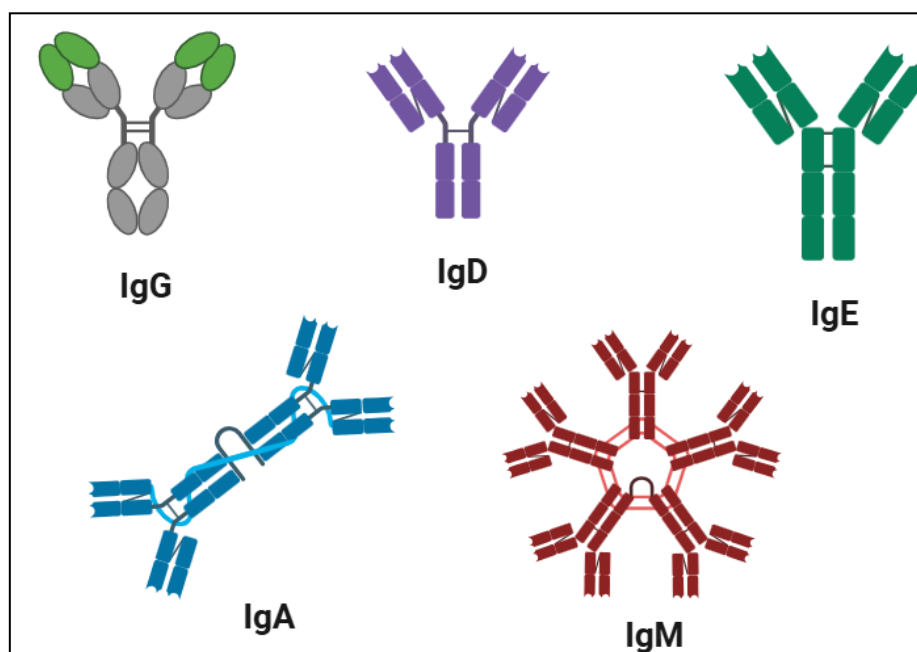
### 10.2. Anticuerpos

Un inmunosensor hace referencia a aquel sensor en donde el transductor está modificado con anticuerpos o fracciones de anticuerpos, cuyo fundamento son las interacciones entre las regiones de reconocimiento de un anticuerpo, denominadas paratope, hacia una región de reconocimiento de un antígeno específico, denominada epítipo.

Es importante tener claro el concepto de anticuerpo, siendo este la parte distintiva de un inmunosensor. Un anticuerpo, también llamado inmunoglobulina es una proteína globular producida por el sistema inmunológico de cualquier organismo perteneciente a la categoría vertebrado (humanos y animales) en respuesta a la presencia de antígenos específicos (como patógenos o moléculas extrañas)<sup>190</sup>.

Desde el punto de vista de los biosensores, los anticuerpos son utilizados como elementos de reconocimiento biológico, debido a su alta especificidad y afinidad por sus antígenos. Los anticuerpos se inmovilizan en la superficie del sensor para captar moléculas objetivo (antígenos), en donde esta interacción puede ser medida y cuantificada a partir de una señal óptica, eléctrica, térmica o mecánica, dependiendo del tipo de transductor utilizado en el dispositivo.

Las inmunoglobulinas se agrupan en cinco clases principales: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, con propiedades antigénicas únicas presentes en sus cadenas pesadas (región constante), cada una designada con su propia clase de cadena pesada:  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , respectivamente<sup>191</sup>. La Figura 16 representa los anticuerpos presentes en los mamíferos.



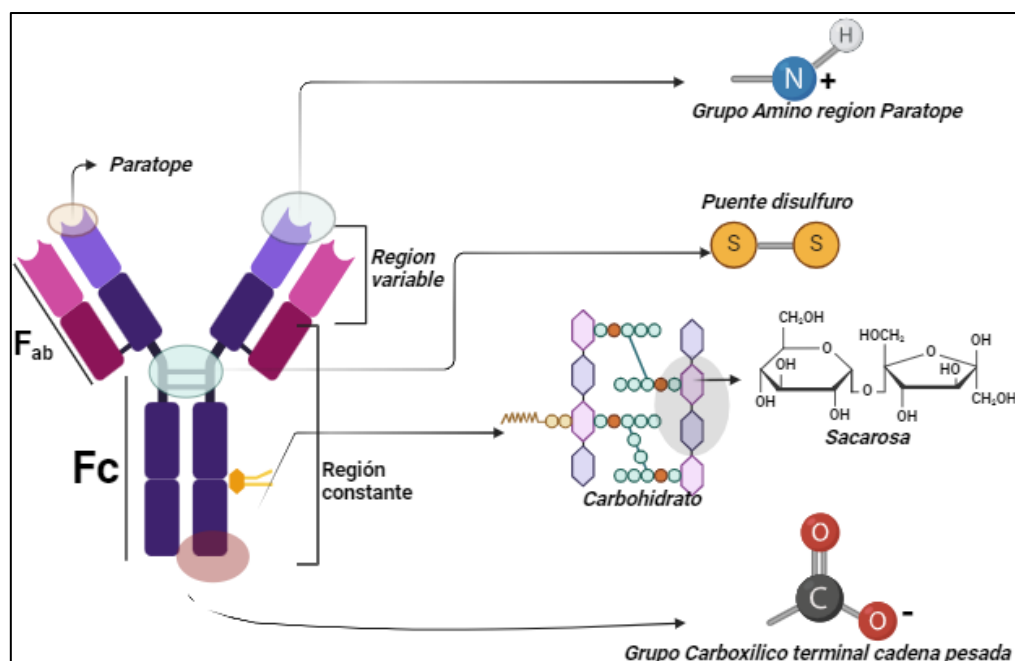
**Figura 16.** Representación esquemática de las cinco clases de inmunoglobulinas en mamíferos.

La IgG y la IgA se dividen en subclases según sus diferencias antigénicas dentro de cada una de las cinco clases. En los seres humanos, la IgG tiene cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que tienen cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  y  $\gamma 4$ , respectivamente, mientras que la IgA tiene dos subclases: IgA1 e IgA2. La IgM, la IgD y la IgE no tienen subclases. Cada clase y subclase tiene sus propias características. Los anticuerpos son proteínas de unión a antígenos que están presentes en la membrana de las células B y son secretadas por las células plasmáticas<sup>192</sup>.

La molécula de anticuerpo es bivalente ya que posee dos sitios de unión al antígeno. Como se observa en la Figura 17, una inmunoglobulina (IgG) es una molécula en forma de Y que consta de 4 cadenas de polipéptidos, de las cuales dos son denominadas cadenas ligeras (color violeta, simbolizadas normalmente con la letra L), las que son idénticas y que constan de aproximadamente 220 residuos de aminoácidos, y dos cadenas pesadas (color morado simbolizadas con la letra H), también idénticas que constan de aproximadamente 440 aminoácidos unidos por enlaces disulfuro e interacciones no covalentes. Por lo tanto, una IgG es un dímero de la cadena H-L. Cada cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina tiene dos regiones o dominios: dominio variable y dominio constante. La mitad de la cadena ligera y tercera parte de la cadena pesada es denominada región variable (VL), en la cual se encuentran grupos aminos terminales que interaccionan con la región del epítipo del antígeno.

Por otro lado, en la región constante (CL) se encuentran grupos carboxilo terminal en ambas cadenas. Estas poseen una longitud de aproximadamente 110 aminoácidos. En contraste, la cadena pesada tiene una cuarta parte de la región amino terminal variable (VH) de casi 110 aminoácidos de longitud y las tres cuartas partes restantes son constantes (CH1, CH2, CH3) de casi 330 a 440 aminoácidos de longitud. La unión específica de un anticuerpo con un antígeno se debe a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y pesada.

La IgG presenta dos elementos estructurales que permiten su funcionalidad: uno que se une al antígeno designado como Fab, fragmento de unión al antígeno; el otro denominado Fc, Fragmento cristalizable que no se une al antígeno.



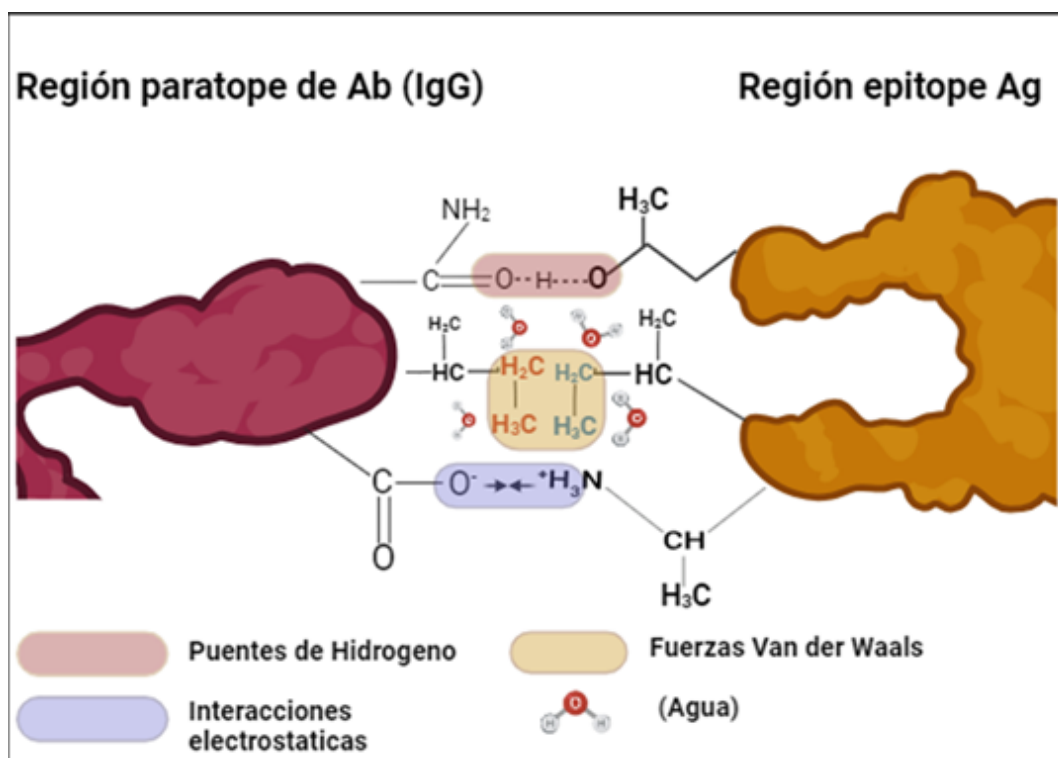
**Figura 17.** Estructura de un anticuerpo IgG y sus grupos funcionales en las regiones Fc y Fab.

Los anticuerpos poseen grupos funcionales  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  y  $\text{-SH}$ , entre otros, que pueden ser utilizados para su funcionalización con otras especies de interés (biotina, proteínas, enzimas, nanomateriales, etc.). El uso de estos grupos funcionales a la hora del desarrollo de un inmunosensor radica en las posibles interacciones que se pueden realizar entre una IgG y la superficie del electrodo (electrodos de carbono vítreo, serigrafiados, ITOs entre otros), además de su conjugación con nanomateriales con propiedades ópticas y/o electroquímicas<sup>193</sup> que mejoran la sensibilidad a la respuestas electroquímicas y luminiscentes en una interacción antígeno – anticuerpo (Ag – Ab).

### 10.2.1. Interacciones Antígeno - Anticuerpo

La gran selectividad de los anticuerpos viene dada por la estereoespecificidad de los puntos de unión con el antígeno (paratope), la que es limitada a una región definida que contiene la región determinante de la complementariedad permitiendo únicamente la combinación del anticuerpo con aquellas moléculas que contienen una estructura del epítipo particular. Los anticuerpos permiten la detección y cuantificación de antígenos a niveles muy bajos (concentraciones de orden de picomolar) en muestras tan complejas

como suero o plasma. Esto se debe a los elevados valores de constante de asociación antígeno - anticuerpo (Ag - Ab), los que son superiores a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . La selectividad de la interacción con el antígeno está directamente relacionada con los diferentes tipos de interacciones Ag - Ab<sup>194</sup> las cuales se observan en la Figura 18.



**Figura 18.** Mecanismos de interacción y/o unión Ab – Ag.

Dentro de las interacciones Ab - Ag de importancia se encuentran:

- I. Puentes de hidrógeno, los que ocurren al compartir un átomo de hidrógeno entre dos átomos electronegativos, como el oxígeno en los grupos carboxílicos y el nitrógeno en los grupos aminos.
- II. Fuerzas electrostáticas, en las cuales ocurre una atracción entre grupos cargados positiva y negativamente que forman los llamados puentes salinos. Estos son los enlaces no covalentes más fuertes, pero son relativamente poco comunes en las interacciones Ab - Ag.
- III. Interacciones hidrofóbicas, las que acontecen debido a la interacción de los grupos hidrófobos del anticuerpo con una región similar del antígeno, excluyendo las moléculas de agua del espacio entre el anticuerpo y el antígeno para lograr una interacción termodinámicamente estable.

- IV. Fuerzas de van der Waals, son interacciones débiles debido a la polarización de ciertas regiones moleculares. Sin embargo, en su sumatoria se vuelven fuertes cuando una gran superficie del anticuerpo se acerca a una gran superficie del antígeno. Pueden variar en proporción a la distancia entre el epítoto antigénico y el paratope en el anticuerpo. Estas fuerzas de atracción disminuyen rápidamente a medida que las moléculas se separan o aumentan drásticamente a medida que se acercan.

### **10.2.2. Inmovilización de anticuerpos sobre superficies electrónicas**

En los inmunosensores los anticuerpos se inmovilizan en la superficie del electrodo. Esta etapa es la más importante en el desarrollo de un inmunosensor, la cual determinará el tiempo de vida y la sensibilidad del elemento de reconocimiento inmovilizado. El objetivo principal es permitir un contacto eficaz entre el anticuerpo y el transductor, manteniendo su estabilidad y capacidad de reconocimiento. Algunos de los requisitos que debe cumplir el proceso de inmovilización del anticuerpo son los siguientes:

- I. Retención de la actividad biológica de las biomoléculas después de la inmovilización sobre la superficie del sensor.
- II. Unión reproducible, y estable con el sustrato frente a variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica y naturaleza química del microambiente.
- III. Localización uniforme, densa y orientada de los anticuerpos.

Estos métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grupos: físicos, donde incluye la adsorción y el atrapamiento; químicos, los que se basan en la formación de enlaces entre la superficie del electrodo y el anticuerpo. Algunos de estos métodos de inmovilización se describen a continuación:

Adsorción física: el anticuerpo se pone en contacto con la superficie del electrodo y se adsorbe físicamente por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Aunque es un método muy sencillo, no permite una modificación ordenada del anticuerpo sobre el electrodo y, aleatoriamente, puede que la zona de reconocimiento no esté disponible para la formación del complejo<sup>195</sup>.

Enlace covalente: unión covalente entre el anticuerpo y la superficie del electrodo por medio de grupos bifuncionales o espaciadores como glutaraldehído, lisina, entre otras. Aunque más complejo que otros métodos, permite obtener superficies más estables y reproducibles<sup>196</sup>.

Unión de afinidad: en este método se modifica la superficie del electrodo con alguna especie (por ejemplo, Proteína G) que interaccione por afinidad con la región constante de un anticuerpo<sup>196</sup>.

Atrapamiento polimérico: el anticuerpo puede quedar retenido en una membrana polimérica depositada sobre la superficie del electrodo. El polímero puede funcionar como una barrera protectora de moléculas interferentes.

Monocapas autoensambladas (por sus siglas en inglés SAM): son monocapas de un compuesto generadas espontáneamente sobre la superficie del electrodo. Este compuesto tiene un extremo con alta afinidad por el material de la superficie del electrodo, mientras que el otro extremo deja libre un grupo funcional que puede interactuar con el anticuerpo (normalmente, formando un enlace covalente). Son típicas las SAM de tioles sobre una superficie de oro. Este método suele presentar menor adsorción inespecífica y un mejor control de la orientación de anticuerpos<sup>197</sup>.

En cuanto al material de composición de los electrodos utilizados en inmunosensores, los electrodos de carbono son de bajo costo y brindan un rendimiento excelente en sensores debido a una amplia ventana de potencial de trabajo, baja resistencia y corrientes residuales bajas. Los electrodos serigrafiados se han utilizado ampliamente en aplicaciones de sensores electroquímicos debido a su producción en masa, bajo costo y su facilidad de diseño y miniaturización. Los electrodos de óxido de estaño dopado con indio (ITO, por sus siglas en inglés) son comúnmente utilizados en la fabricación de sensores, incluidos los inmunosensores, debido a sus propiedades eléctricas, ópticas y químicas favorables. Los electrodos ITO tienen una alta conductividad eléctrica, lo que les permite medir fácilmente los cambios en la corriente eléctrica generados por las reacciones electroquímicas que ocurren en los inmunosensores. Además, son transparentes en el espectro visible y cercano al infrarrojo, lo que permite la detección óptica de las señales generadas por el inmunosensor. Esto es especialmente útil en los inmunosensores electroquimioluminiscentes.

### 10.3. Inmunoensayos

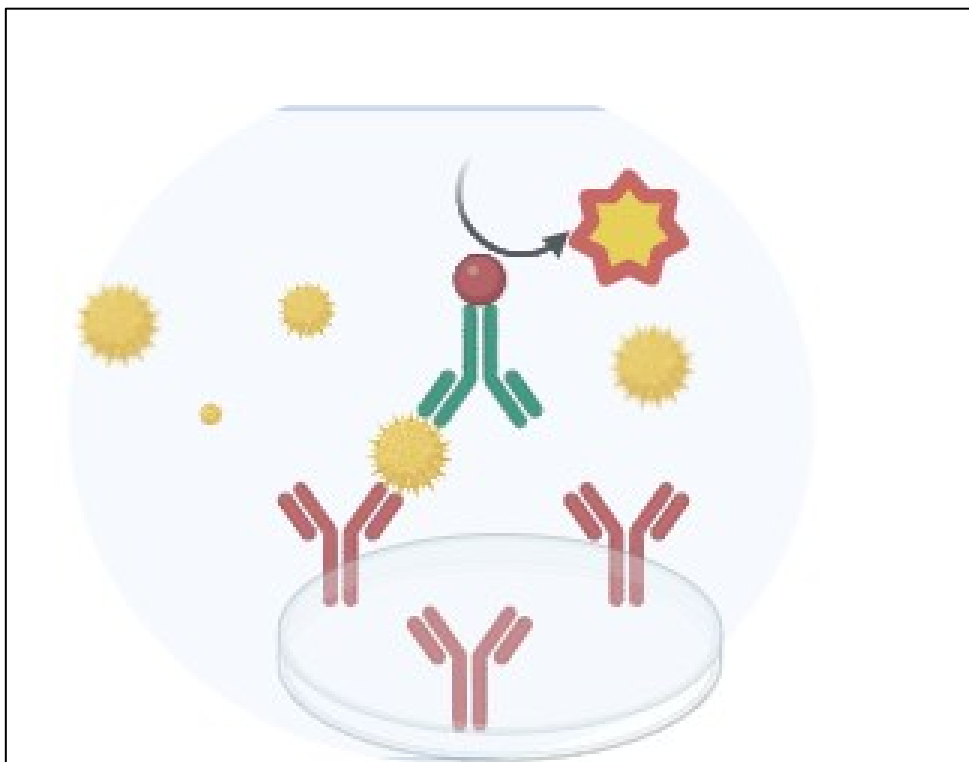
La base práctica de los inmunosensores se fundamenta en un conjunto de técnicas analíticas que estudian la selectividad de los anticuerpos hacia antígenos específicos. A partir de esta interacción, se analizan procesos químicos y cinéticos, permitiendo obtener una amplia gama de resultados que facilitan la identificación de respuestas con alta especificidad a nivel molecular. Estas técnicas de detección basadas en la interacción Ab - Ag dentro de un biosensor se conocen como inmunoensayos. En un inmunoensayo se utilizan anticuerpos como reactivos inmunológicos debido a su alta selectividad hacia su objetivo específico, incluso en presencia de una gran variedad de otros materiales en una muestra (denominadas interferentes en la matriz compleja)<sup>198</sup>.

La alta sensibilidad y selectividad de las inmuno reacciones junto con la disponibilidad de anticuerpos para una amplia gama de moléculas hacen que los métodos inmunoquímicos sean herramientas útiles en una gran variedad de aplicaciones<sup>199</sup>. Dentro de los inmunoensayos se encuentran el radioinmunoensayo<sup>200</sup>, el ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA)<sup>201</sup>, la inmunofluorescencia, el inmunoensayo quimioluminiscente<sup>202</sup>, la fluorescencia ligada a enzimas, entre otras técnicas.

Los inmunoensayos pueden ser directos o indirectos, lo que significa que el mecanismo de detección funciona directamente a través de la interacción Ab - Ag, o se utiliza una etiqueta adicional, como una enzima o una molécula/nanopartícula luminiscente, para detectar si se ha producido un evento de unión Ab - Ag. A partir de dicha interacción, se pueden desarrollar varias metodologías de detección del antígeno de interés en el inmunosensor.

Debido a su amplia aplicabilidad en múltiples análisis e investigaciones científicas, además de su practicidad para obtener un resultado con un rango elevado de sensibilidad, la técnica de detección ELISA, es sin duda alguna el método estándar que sirve como base para el principio de la mayoría de los inmunosensores desarrollados en los últimos tiempos. Dentro de los distintos tipos de ensayos ELISA que se pueden realizar, teniendo en cuenta la molécula objetivo a medir (sean el antígeno o el anticuerpo), se encuentran el ensayo indirecto, el competitivo y el ensayo tipo sándwich de anticuerpos<sup>203</sup>.

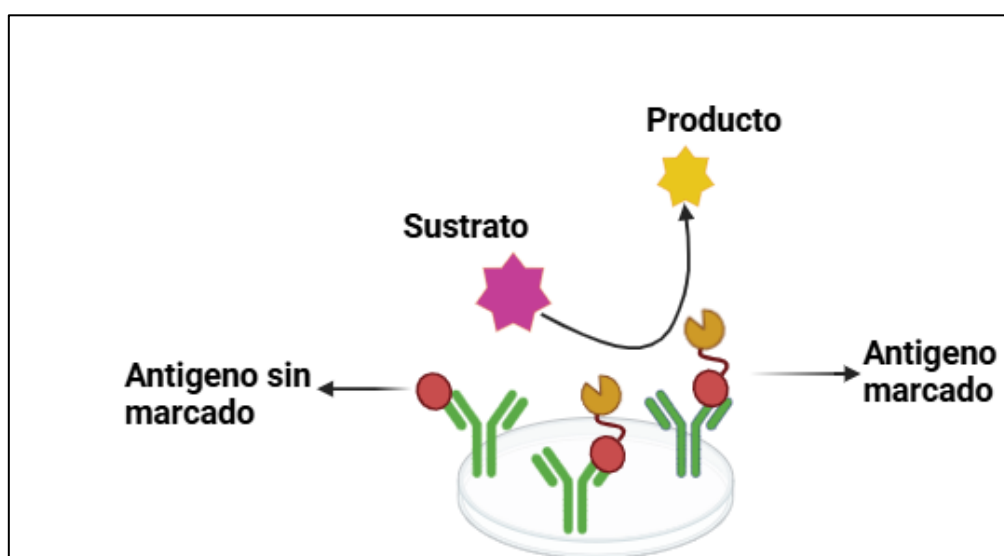
En el inmunoensayo tipo sándwich, el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos como una especie de sándwich (de allí deriva su nombre), es decir se “encaja” entre dos anticuerpos (un anticuerpo inmovilizado sobre una superficie, denominado anticuerpo primario, y anticuerpo marcado con una enzima, molécula o nanopartícula con propiedades luminiscentes y/o redox, denominado anticuerpo secundario) como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Inmunoensayo de formato tipo sándwich. El antígeno queda capturado sobre un anticuerpo inmovilizado sobre la superficie del electrodo y un anticuerpo marcado con una enzima.

Cuando se realiza un inmunoensayo de este formato sobre un electrodo, primero se recubre la superficie del electrodo con una cantidad constante de anticuerpo de captura, luego se realizan agregados de diluciones del antígeno para que ocurra la interacción Ab - Ag. Los antígenos no unidos se eliminan mediante lavados. A continuación, se agrega un anticuerpo secundario marcado con una enzima específica. Después de un lavado para eliminar cualquier anticuerpo secundario marcado con enzima no unido, se añade una solución de sustrato a todo el inmunosensor y se desarrolla una respuesta ya sea colorimétrica o electroquímica. Esta señal de respuesta se vuelve más intensa a medida

que aumenta la concentración de antígeno en la muestra<sup>204</sup>. Los inmunoensayos competitivos directos implican la inmovilización de un anticuerpo sobre una superficie, en el caso de un inmunosensor electroquímico sobre un electrodo; el antígeno (molécula target) y el antígeno marcado, ya sea con una enzima (por ejemplo, HRP) o con un luminóforo, compiten por los sitios limitados de unión del anticuerpo. La cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo se cuantifica mediante la respuesta, por ejemplo, electroquímica, donde la corriente es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno libre en la muestra<sup>205</sup>. La Figura 20 describe un inmunosensor basado en este tipo de inmunoensayo.



**Figura 20.** Inmunosensor basado en el principio de funcionamiento de un inmunoensayo competitivo. Los antígenos compiten por los sitios de uniones disponibles de los anticuerpos.

En un inmunoensayo competitivo, una de las variantes consiste en agregar primero el antígeno no marcado, seguido del antígeno marcado, llevando a cabo una pseudo-competencia. En este tipo de ensayo, el antígeno no marcado (analito) se añade al inicio y se une a los sitios de unión del anticuerpo en la fase sólida. Posteriormente, se introduce el antígeno marcado. La cantidad de antígeno marcado que se une a los sitios disponibles es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Es decir, a mayor concentración del analito, menor será la cantidad de antígeno marcado que se unirá, y menor la señal medida.

## **11. Bioconjugación de antígenos y anticuerpos con nanopartículas**

La bioconjugación, es el proceso por medio del cual se busca unir una molécula biológica con un nanomaterial o molécula que permita la posterior cuantificación de la interacción de la biomolécula con un elemento de reconocimiento. En inmunosensores, la conjugación de anticuerpos y antígenos con nanomateriales se debe a las propiedades únicas de los nanomateriales, que mejoran la sensibilidad, estabilidad y eficiencia en la detección analítica de analitos de interés. Dentro de las propiedades y características fisicoquímicas de los nanomateriales utilizados en la conjugación con antígenos y anticuerpos se encuentran propiedades redox definidas, altos coeficientes de absorción, largos tiempos de vida excitada y excelente estabilidad química, lo que permite una mayor eficiencia en la generación de señales luminiscentes<sup>206</sup>. Además, su alta relación superficie/volumen facilita la inmovilización eficiente de biomoléculas sin afectar su actividad biológica<sup>207</sup>.

Los nanomateriales, además, pueden diseñarse con grupos funcionales superficiales específicos (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH) que facilitan la bioconjugación covalente, mejorando la reproducibilidad del biosensor. En inmunosensores, esta conjugación optimizada mejora la selectividad y permite la detección de analitos en concentraciones ultra bajas con límites de detección nanomolares a subpicomolares<sup>208</sup>.

### **11.1. Bioconjugación con puntos cuánticos**

Dentro de los nanomateriales y nanopartículas con mayor aplicación y uso en la bioconjugación en inmunosensores, se encuentran los QD, los cuales pueden ser implementados como marcadores e indicadores ópticos. A partir del enfoque de aplicación que se les otorgue a los QD, los biosensores como los inmunosensores se pueden fabricar mediante tres enfoques diferentes:

I. El primer enfoque es el uso de QD como etiquetas luminiscentes para detectar moléculas objetivo, es decir, la bioconjugación de los antígenos de interés con QD semiconductores. Los anticuerpos inmovilizados son responsables del reconocimiento de antígenos objetivo y de la biomolécula conjugada con el QD, siendo la respuesta luminiscente de los QD el parámetro para cuantificar la cantidad de analito inmovilizado

sobre el anticuerpo. Debido a que los QD se pueden excitar mediante tres fuentes diferentes, como absorción de luz, reacciones químicas y reacción de oxido - reducción entre el electrodo y un coreactante, los biosensores luminiscentes basados en QD incluyen principalmente un biosensor fotoluminiscente<sup>209</sup>, quimioluminiscente<sup>210</sup>, y electroquimioluminiscente<sup>211</sup>.

II. Como segundo enfoque, se destaca la detección de la variación de las señales luminiscentes de los QD presentes en el inmunosensor, en respuesta al antígeno objetivo. Esta variación de señal está directamente relacionada con la transferencia de electrones<sup>212</sup> y de cargas<sup>213</sup> entre el QD y las moléculas cercanas. Debido a que la emisión de luminiscencia del QD depende de los estados superficiales del mismo (estados trampas y agentes de recubrimientos)<sup>214,215</sup> la unión de antígenos o anticuerpos en la superficie del QD puede provocar la extinción o mejora de la luminiscencia del mismo. Este mecanismo estaría directamente relacionado a la desactivación de los estados radiativos a partir de los procesos de apagamiento de la luminiscencia.

III. El tercer enfoque se basa en los mecanismos de transferencia de energía en los que se encuentran involucrados los QD; estos mecanismos ocurren entre el QD y la biomolécula conjugada a su superficie o alguna de las partes del biosensor como lo es la superficie electródica modificada. Estos mecanismos son el mecanismo ya mencionado FRET<sup>216,217</sup> así como también se destacan sus homónimos como el mecanismo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET)<sup>218,219</sup>, la transferencia de energía de resonancia de quimioluminiscencia (CRET)<sup>220</sup> y el mecanismo de transferencia de energía de resonancia de EQL (ERET)<sup>221,222</sup>.

#### **11.1.1. Funcionalización superficial de los puntos cuánticos**

La funcionalización superficial de los QD es un proceso crucial que permite su integración en sistemas biológicos y uso en aplicaciones como el diagnóstico, la bioimagen y la detección de biomoléculas. Este proceso implica modificar la superficie de los QD para mejorar su estabilidad en medios acuosos, incrementar su biocompatibilidad y permitir la unión específica con biomoléculas como anticuerpos y antígenos. Además, la capa de recubrimiento asociada con los QD preserva las propiedades fotofísicas de las nanopartículas y, a menudo, permite la modificación de electrodos con QDs, así como también la unión con biomoléculas.

Cuando el proceso de estudio es de naturaleza biológica, se requiere que la superficie del QD esté diseñada para que la nanopartícula sea soluble en medio acuoso. Debido a esta condición, la selección del ligando superficial del QD es importante, puesto que permitirá la bioconjugación con antígenos o anticuerpos en el caso de inmunosensores, así como también la modificación de las propiedades ópticas y electroquímicas de los QD debido a efectos de confinamiento cuántico<sup>223</sup>.

Como consecuencia de la modificación superficial de los QD con ligandos, se incluyen inestabilidad del recubrimiento molecular, modificación de las propiedades ópticas como la disminución del rendimiento cuántico luminiscente, aglomeración entre nanocristales y poca versatilidad. Un problema común de estas estrategias es el aumento del tamaño final de los QD, lo que plantea limitaciones en aplicaciones en biosensores.

La Figura 21 representa algunas estrategias desarrolladas para estabilizar los QD en soluciones acuosas, que también se pueden aplicar para unir los QD con unidades moleculares funcionales a través de la unión covalente o no covalente de dichas unidades a los ligandos solubilizantes en agua<sup>224,225</sup>.

Cada segmento etiquetado (A, B, C, D, E, F) indica diferentes tipos de moléculas o ligandos utilizados en la funcionalización:

(A) tioles: ligandos que contienen grupos funcionales terminales como aminas ( $-NH_2$ ) y ácidos carboxílicos ( $-COOH$ ), utilizados para mejorar la dispersión en medios acuosos y para facilitar la formación de enlaces covalentes con biomoléculas (ej., proteínas o anticuerpos). Estos grupos se unen covalentemente al QD mediante enlaces entre el grupo azufre ( $-S$ ) y los metales superficiales del QD<sup>226</sup>.

(B) grupos ditiolados: los grupos tiol se unen directamente a los átomos metálicos de la superficie del QD mediante enlaces covalentes, formando enlaces metal - tiol ( $M - S$ ). En el caso de ligandos ditiolados, ambos grupos tiol pueden coordinarse simultáneamente con uno o más átomos de la superficie, creando una unión más estable que con un solo grupo tiol. En sus extremos contienen grupos carboxílico ( $-COOH$ ) y/o amina ( $-NH_2$ )<sup>227</sup>.

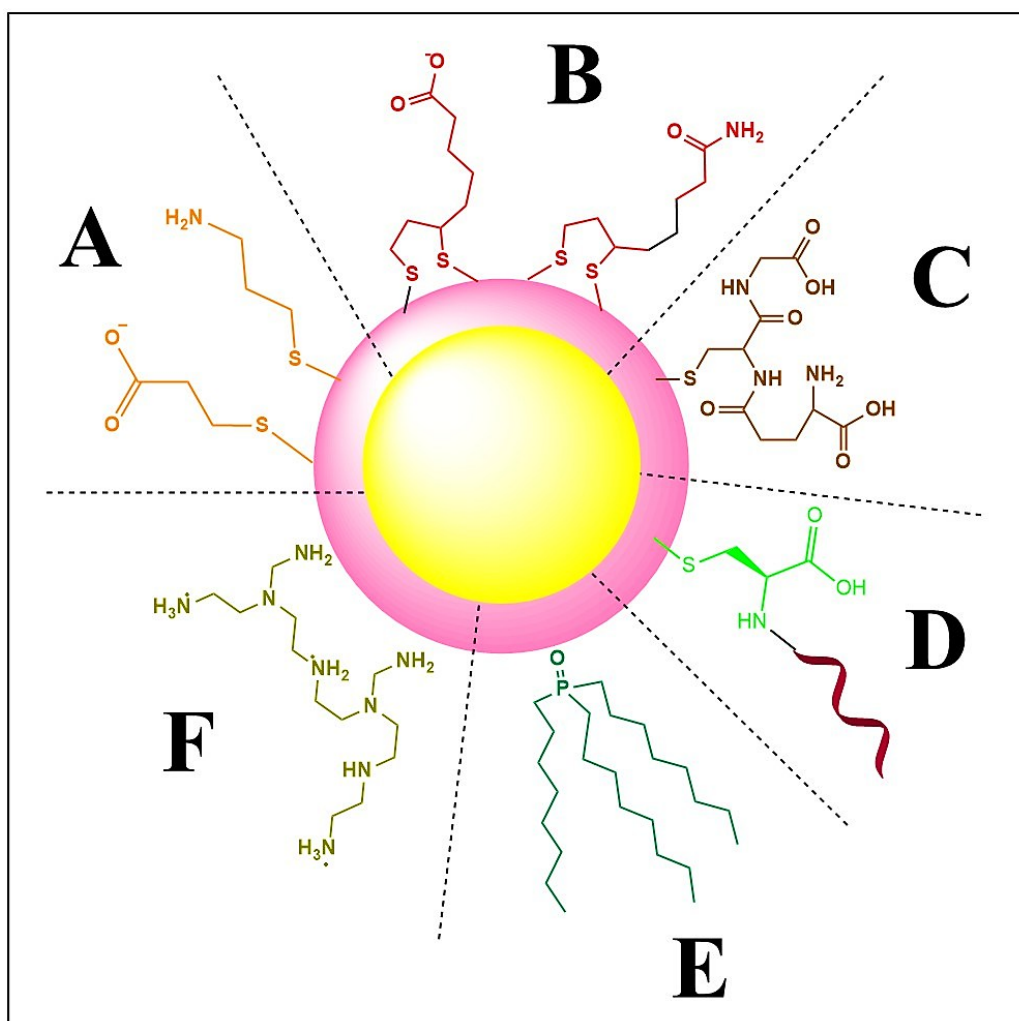
(C) glutaciones: el glutatión es un tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura química cuenta con grupos funcionales clave que le permiten actuar como un excelente ligando para la funcionalización de QD. También se usan para evitar

la agregación de los QD. Los grupos carboxilo y amino libres del glutatión permiten la unión de biomoléculas específicas. Esto es clave para diseñar biosensores y sistemas de administración de medicamentos<sup>228</sup>.

(D) péptidos modificados con cisteína: la cisteína es un aminoácido que se caracteriza por su grupo funcional tiol (-SH), el cual tiene una alta afinidad por superficies metálicas, como las de los QD. Cuando se conjuga con péptidos, se obtienen estructuras funcionales que combinan las propiedades específicas de los péptidos (como la capacidad de reconocimiento biológico) con la estabilidad y funcionalización que proporciona la cisteína<sup>229</sup>.

(E) óxido de trioctilfosfina (TOPO): ligando orgánico ampliamente utilizado para la estabilización y funcionalización de QD, especialmente en su síntesis y aplicaciones en medios no acuosos. El grupo fosfina (P=O) es altamente polar y actúa como un sitio de coordinación fuerte hacia los iones metálicos en la superficie de los QD (por ejemplo,  $\text{Cd}^{2+}$  en CdSe). Las cadenas de octilo son hidrofóbicas, lo que confiere al QD una alta solubilidad en solventes orgánicos no polares (como tolueno, hexano o cloroformo). Estas cadenas también evitan la agregación al proporcionar una barrera estérica alrededor de ellos<sup>230</sup>.

(F) aminas poliméricas: moléculas orgánicas que contienen grupos amina en su estructura. Estas se utilizan como ligandos en los QD debido a su capacidad para estabilizar y funcionalizar la superficie de los puntos cuánticos, facilitando su uso en diversas aplicaciones, especialmente en entornos biológicos y en medios acuosos. Los grupos amina de las poliaminas interactúan con los sitios cargados negativamente en la superficie de los QD (por ejemplo, átomos de S o Se en CdS o CdSe). Esta interacción electrostática es reversible, lo que permite ajustar la funcionalización según sea necesario<sup>231</sup>.

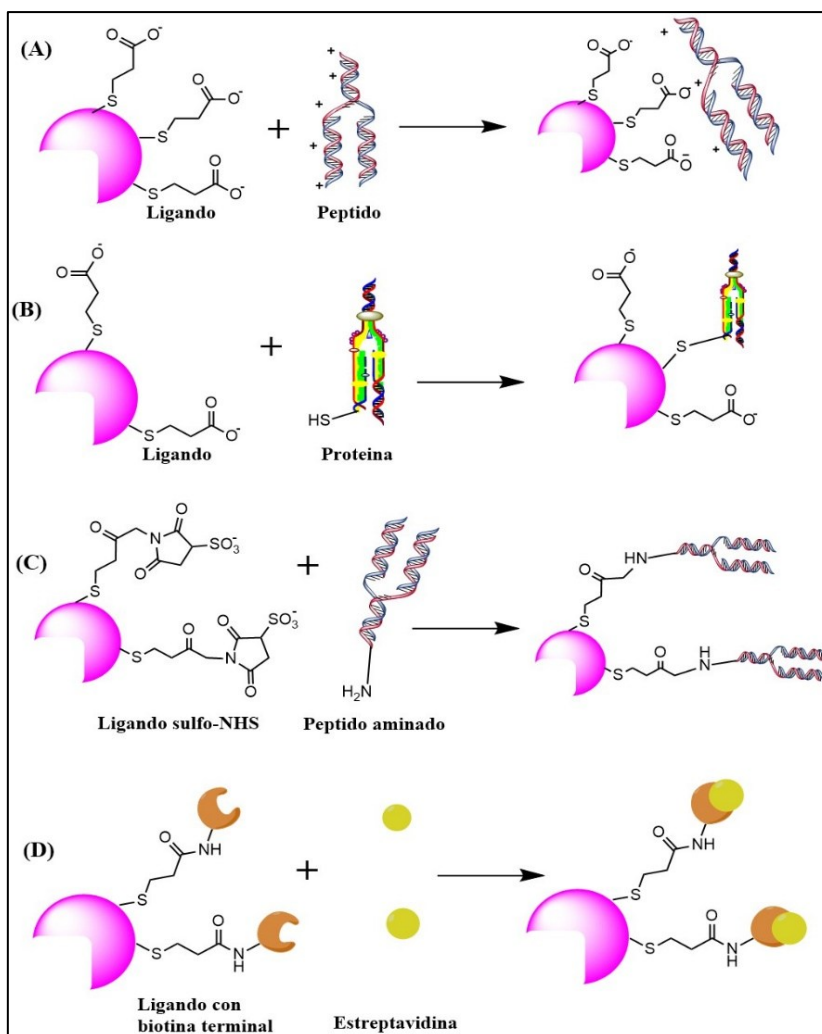


**Figura 21.** Alternativas para la modificación de la superficie de QDs. Intercambio de ligando con (A) grupos mercaptoamonio o mercaptocarboxílico; (B) derivados de grupos ditiolanos (ácido lipoico); (C) glutatión; (D) péptidos modificados con cisteína; (E) encapsulación de QD hidrofóbicos mediante autoensamblaje con cationes, aniones o polímeros anfífilicos (TOPO); (F) poliaminas.

### 11.1.2. Estrategias de bioconjugación

Al momento de seleccionar los parámetros para la bioconjugación con QDs o diferentes nanomateriales, la elección de la estrategia de conjugación es dependiente de varios factores, entre ellos el tamaño, la forma, la química de la superficie y la estructura de las nanopartículas, su material intrínseco, la naturaleza de los ligandos de la superficie de las nanopartículas y sus grupos funcionales disponibles, el tipo de molécula biológica, su

tamaño, su composición química y la utilidad deseada en la aplicación final. Además, es importante tener claro aspectos como ¿Cuál es el mejor sitio en la biomolécula para la conjugación con nanopartículas? ¿Cómo afecta la química superficial de las nanopartículas a la estructura de la biomolécula? ¿Qué tipos de interacciones dominan la interfaz biomolécula – nanopartícula? ¿Se pueden usar las nanopartículas para perturbar localmente la estructura de la biomolécula? Las estrategias para unir una biomolécula a la nanopartícula han adoptado cuatro enfoques principales tal y como se muestran en la Figura 22.



**Figura 22.** Estrategias de conjugado de nanopartículas – biomoléculas: (A) interacción electrostática, (B) enlace directo del aminoácido en el núcleo de la nanopartícula, (C) unión covalente al ligando de la nanopartícula, (D) unión de un cofactor proteico a la nanopartícula (interacciones secundarias)<sup>232,233</sup>.

## 11.2. Cuantificación de la respuesta de detección en inmunosensores

La cuantificación de la respuesta en inmunosensores se basa en la evaluación entre la señal generada y la concentración del analito de interés, utilizando modelos matemáticos y curvas de calibración<sup>234</sup>. Dependiendo del transductor empleado, la respuesta se relaciona con la cantidad de antígeno presente mediante ecuaciones sigmoideas o de regresión logarítmica. Este comportamiento se debe a que la interacción entre un anticuerpo con un antígeno está gobernada por la ley de acción de masas, la que define comportamientos asintóticos para bajas y altas concentraciones, por ejemplo, el analito. Para garantizar precisión y sensibilidad, se determinan parámetros como el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ), los cuales dependen del ruido de fondo y la estabilidad del sensor. Además, factores como la afinidad del anticuerpo, el método de inmovilización y las condiciones experimentales determinan la sensibilidad, la reproducibilidad y linealidad de la respuesta, lo que requiere la optimización del sistema para obtener detecciones en rangos sub-nanomolares con alta selectividad<sup>235</sup>.

La elección del modelo de calibración en inmunosensores depende del tipo de interacción Ab - Ag, la dinámica de unión y el rango de concentraciones a analizar. Una fuente importante de variabilidad en las curvas de calibración puede provenir de la elección del modelo estadístico utilizado.

### 11.2.1. Modelo lineal

Descrito como el modelo de calibración más simple y sencillo de tratamiento de las respuestas de un inmunoensayo, el cual se rige por la ecuación:

$$I_{rpta} = a + b \times c + \text{error} \quad (19)$$

donde los parámetros  $a$  y  $b$  son el intercepto y la pendiente respectivamente, el término  $I_{rpta}$  hace referencia a la respuesta o la lectura de la señal, como la corriente, densidad óptica o la fluorescencia de un inmunoensayo. A menudo, este modelo lineal se ajusta después de la transformación logarítmica de la respuesta y la concentración, o cuando se trabaja con concentraciones de analito acotadas. A veces se lo denomina modelo lineal logarítmico - logarítmico<sup>236</sup>.

### 11.2.2. Modelo cuadrático

El modelo cuadrático se emplea en inmunoensayos cuando la relación entre la concentración del analito y la señal de respuesta no sigue una función estrictamente lineal, pero tampoco presenta una saturación sigmoidea clara. Este modelo se basa en una ecuación de segundo grado:

$$I_{rpta} = A + (B \times c) + (C \times c^2) + \text{error} \quad (20)$$

donde A, B y C son los coeficientes de intersección de los términos lineal y cuadrático, respectivamente. Este modelo se aplica en inmunoensayos donde la cinética de unión antígeno - anticuerpo genera una respuesta que se acelera o desacelera progresivamente con la concentración (c). Se aplica además en inmunoensayos donde la relación entre la concentración y la señal de salida sigue una tendencia parabólica debido a efectos de amplificación o inhibición. No es adecuado cuando la señal alcanza un punto de saturación definido<sup>237</sup>.

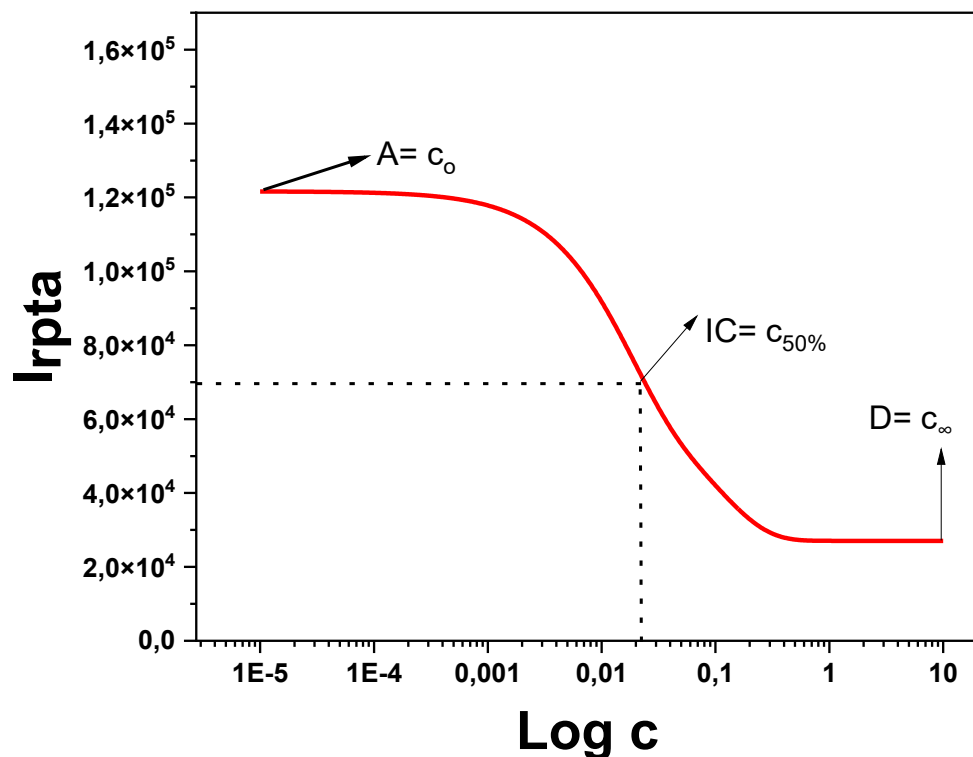
### 11.2.3. Modelo logístico

Se aplica cuando la respuesta del sistema presenta una curva sigmoidea, típica de interacciones antígeno - anticuerpo con saturación, con un límite inferior (asíntota) cerca de la respuesta de fondo debido a la no discriminación de concentraciones similares, y una asíntota superior cerca de la respuesta máxima. Los modelos logísticos de 4 parámetros (4PL) y 5 parámetros (5PL) son ampliamente utilizados en inmunoensayos debido a que describen de manera precisa la relación no lineal entre la concentración del analito y la señal medida. El modelo logístico de 4 parámetros (4PL) se reconoce generalmente como el modelo de referencia de elección para ajustar las curvas de calibración de esta forma. Esta función proporciona una representación precisa de la relación sigmoidea entre la respuesta medida y la concentración del analito<sup>238</sup>.

La ecuación que describe el modelo 4PL es la siguiente:

$$I_{rpta} = D \times \frac{A - D}{1 + \left( \frac{c}{IC_{c50\%}} \right)^B} \quad (21)$$

donde  $I_{rpta}$  es la señal de respuesta,  $D$  es la respuesta a una concentración infinita de analito (altas concentraciones, definida por región asintótica),  $A$  es la respuesta a una concentración cero de analito (o bajas concentraciones, definida por región asintótica contraria),  $c$  es la concentración de analito,  $IC_{c50\%}$  es el punto de inflexión en la curva de calibración en la que se alcanza el 50% de la respuesta máxima (punto que define la sensibilidad de la curva de calibración) y  $B$  es un factor de pendiente (describe la inclinación o pendiente en la zona de respuesta dinámica, a veces llamada pendiente de Hill). Este modelo tiene varias características útiles (Figura 23).



**Figura 23.** Gráfico logístico típico de 4 parámetros para un inmunoensayo en formato competitivo.

La respuesta es monótona, aumenta con la concentración si  $A < D$  y disminuye si  $A > D$  (nótese que se puede lograr la misma flexibilidad permitiendo que  $B$  sea positivo o negativo, pero por convención se supone que  $B$  es mayor que 0). La curva de calibración es simétrica alrededor de la concentración  $IC_{c50\%}$ , con una respuesta a esa concentración de  $(A + D)/2$ . Como la curva tiene forma sigmoidea, la pendiente (es decir, primera derivada) cambia a lo largo de toda la curva, pero en el  $IC_{c50\%}$  la pendiente está dada por  $B(D - A)/4C^{239}$ .

La forma de la curva de calibración, es decir la dependencia con la concentración, dependerá de si el ensayo es competitivo o no competitivo, por ejemplo, tipo sándwich. En algunas ocasiones, el modelo logístico 4PL no satisface la respuesta general del inmunosensor, por lo que el modelo de calibración necesita flexibilidad adicional. En esas situaciones, un modelo 5PL puede funcionar mejor. Este modelo permite ajustar una curva asimétrica añadiendo un parámetro adicional  $G^{240}$ . La ecuación general es la siguiente:

$$I_{rpta} = D \times \frac{A - D}{\left(1 + \left(\frac{c}{IC_{c50\%}}\right)^B\right)^G} \quad (22)$$

el parámetro de asimetría permite que la función se acerque a las asíntotas a diferentes relaciones respuesta vs, concentración, estirando la parte superior o inferior de la curva según la necesidad (en este modelo,  $G > 0$ , pero para lograr la máxima flexibilidad,  $B$  puede ser positivo o negativo). Generalmente, el uso de este modelo es válido solo cuando la asimetría es clara. En situaciones en las que la asimetría es pequeña, la adición de un quinto parámetro puede hacer que el algoritmo de ajuste se vuelva inestable. Un valor de 1 indica simetría perfecta, que correspondería entonces al modelo logístico de cuatro parámetros. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el término  $IC_{c50\%}$  en este modelo no es realmente la  $IC_{c50\%}$ ; es la  $IC_{c50\%}$  cuando el parámetro de asimetría es igual a 1. Corresponderá a algo muy diferente como  $IC_{c20\%}$ ,  $IC_{c30\%}$ ,  $IC_{c80\%}$ , etc., según el valor del parámetro de asimetría para un conjunto de datos en particular<sup>241</sup>.

#### 11.2.4. Modelo exponencial

En inmunosensores, la relación entre la concentración del analito y la señal generada no siempre sigue un comportamiento lineal o sigmoideal. En algunos casos, los modelos exponenciales pueden describir mejor la dinámica de respuesta, dependiendo del mecanismo de detección y la afinidad de los anticuerpos<sup>242,243</sup>. El modelo exponencial describe una relación donde la señal aumenta o disminuye exponencialmente con la concentración del analito, siguiendo la ecuación:

$$I_{rpta} = A + B \times \left(1 - e^{-\left(\frac{c}{C}\right)}\right) \quad (23)$$

donde  $I_{rpta}$  es la respuesta medida, A es el valor mínimo o la línea base de la señal cuando la concentración es 0, B es la amplitud máxima de la señal (la diferencia entre la señal mínima y máxima), c es la concentración del analito, y C es una constante que determina la velocidad de crecimiento de la señal y la sensibilidad del sistema.

Esta ecuación describe cómo la  $I_{rpta}$  aumenta inicialmente de forma rápida con la concentración, pero luego se estabiliza o satura para altos valores de concentración. Este comportamiento es típico en sistemas donde existe una cantidad limitada de sitios de unión (como en los inmunosensores). A bajas concentraciones, el término  $-\left(\frac{c}{C}\right)$  es pequeño, y la señal crece rápidamente porque hay muchos sitios de unión disponibles. Por su parte, a altas concentraciones el término  $1-e^{-\left(\frac{c}{C}\right)}$  tiende a 1, lo que hace que  $I_{rpta}$  se establece en A+B, reflejando que todos los sitios de unión están saturados<sup>244</sup>. La Figura 24 representa una curva de calibración tipo no sigmoideal típicas en inmunosensores.

### 11.3. Determinación de los parámetros estadísticos en inmunoensayos

En inmunoensayos, como en todas las metodologías analíticas, la calibración del sistema requiere evaluar parámetros estadísticos que garantizan la precisión, sensibilidad y confiabilidad del análisis. Como se mencionó anteriormente, las curvas sigmoideas o semiexponenciales presentan una relación no lineal entre la señal y la concentración del analito, ajustándose a ecuaciones logísticas<sup>245</sup>. Dentro de los parámetros estadísticos de mayor relevancia en el análisis de respuestas en inmunoensayos se encuentran:

Límite de detección (LD): es la concentración mínima detectable por el inmunosensor con una señal diferenciable del ruido de fondo. Se calcula como:

$$LD = \frac{3s_y}{m} \quad (24)$$

donde  $s_y$  es la desviación estándar de la señal del blanco, m es la pendiente de la curva en la región lineal. Esta ecuación hace referencia a la tradicional definición del límite de detección; debido a que esta ecuación contempla únicamente errores de tipo I como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido igual a 3, mientras que no contempla los errores tipo II por lo que la ecuación se actualizó y fue aprobada por la

IUPAC<sup>246</sup> contemplando ambos tipos de errores, en donde, para una curva de calibración lineal, se ajusta de la siguiente manera:

$$LD = 3,3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M (y_m - \bar{y})^2}{m-2}}}{m_{pdte}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{M} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{m=1}^M (x_m - \bar{x})^2}} \quad (25)$$

donde  $m_{pdte}$  es la pendiente, el término de la izquierda de la ecuación corresponde al desvío estándar de la regresión,  $M$  el número total de muestras de calibrado,  $n$  de mediciones por cada muestra,  $\bar{x}$  la concentración media del calibrado y  $x_m$  cada uno de los valores de concentración de calibración.

Límite de Cuantificación (LC): es la concentración mínima que puede cuantificarse con precisión. De acuerdo con la definición tradicional se define como:

$$LC = \frac{10s_y}{m} \quad (26)$$

De este modo, el desvío estándar relativo para una concentración igual al LC es del 10%, nivel que se toma convencionalmente como el máximo desvío aceptable para la cuantificación del analito en una muestra. A diferencia del LD, el LC garantiza mayor precisión en la cuantificación. Al igual que LD, el modelo de detección del LC fue ajustado y actualizado para contemplar los errores de las muestras y el blanco, quedando como en la siguiente ecuación:

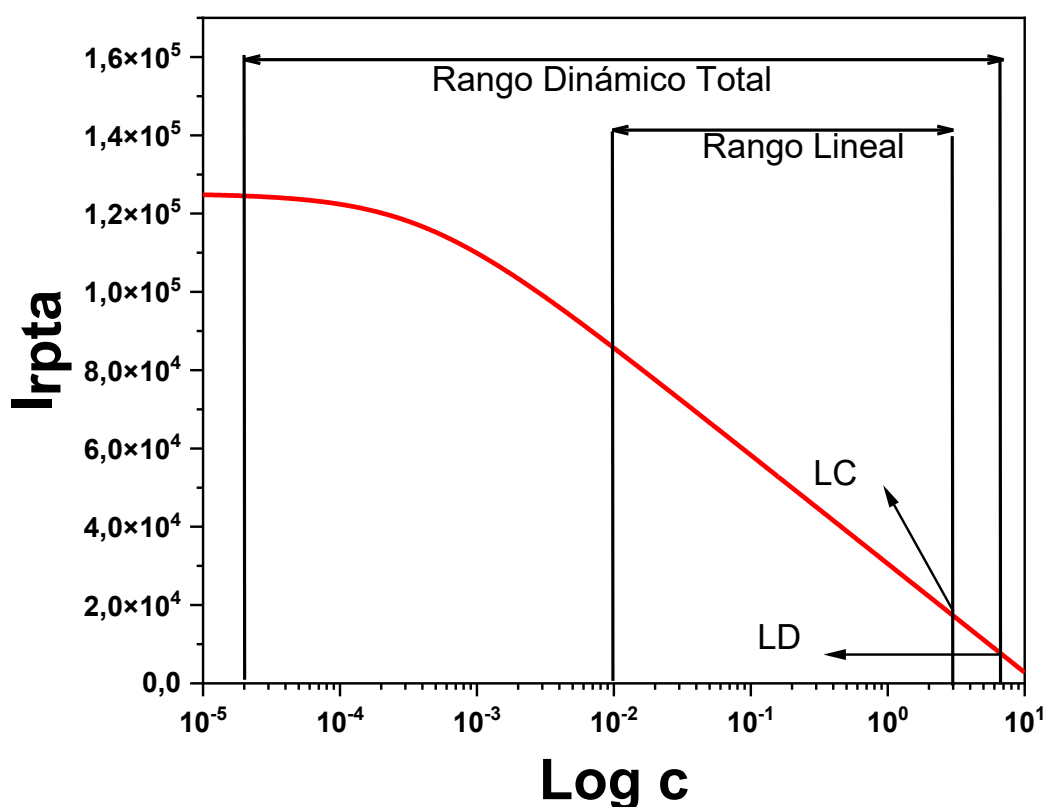
$$LC = 10 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M (y_m - \bar{y})^2}{m-2}}}{m_{pdte}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{M} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{m=1}^M (x_m - \bar{x})^2}} \quad (27)$$

Sensibilidad: la sensibilidad refleja el cambio en la respuesta del inmunosensor por unidad de cambio en la concentración del analito. Matemáticamente, es la pendiente de la curva de calibración.

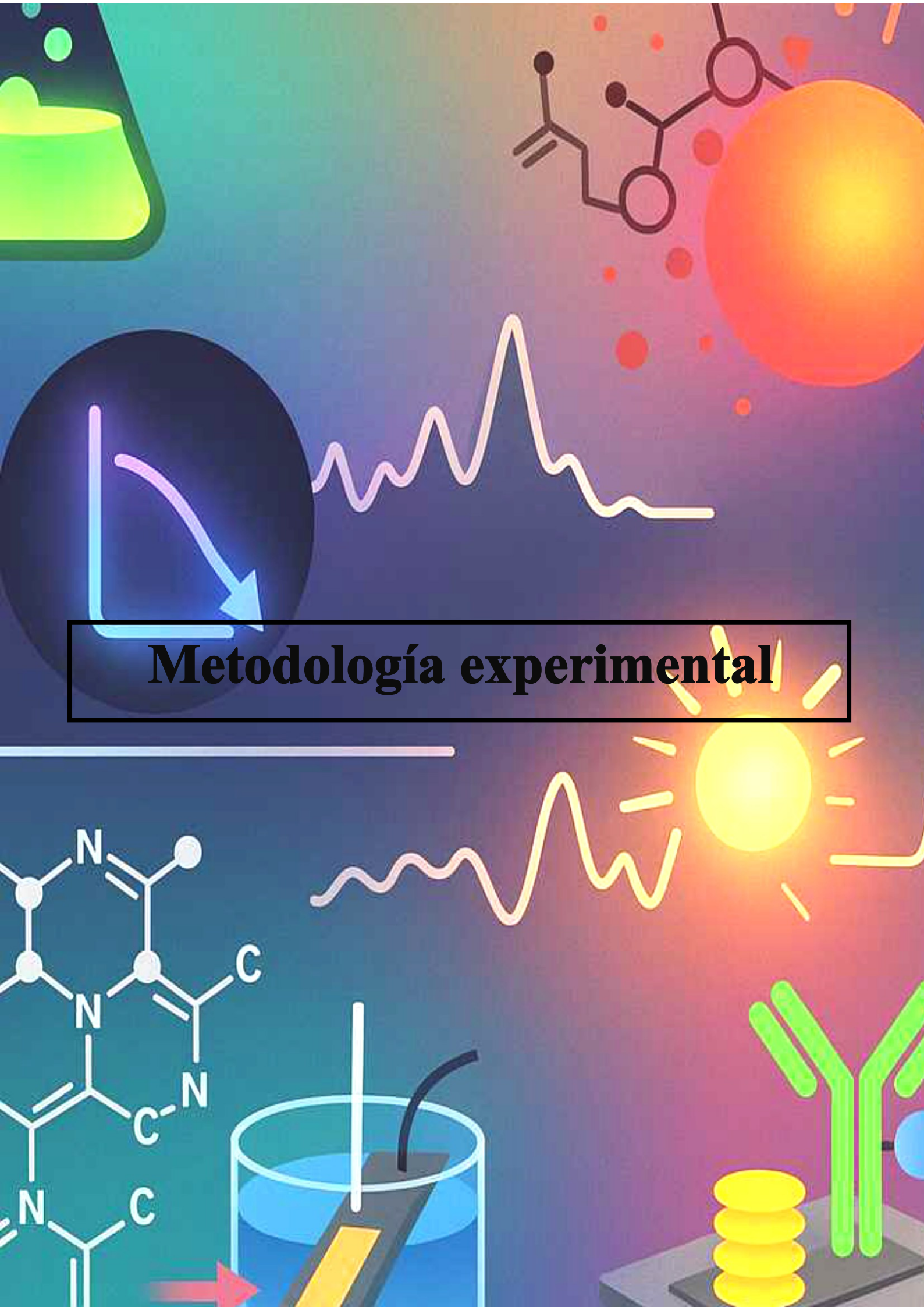
Rango: dentro de los parámetros de calibrado en inmunosensores, la respuesta de las interacciones antígeno - anticuerpo, se encuentran el rango dinámico y el rango lineal. El rango dinámico total de una curva de calibración abarca desde el LD hasta la concentración en la que la respuesta deja de aumentar proporcionalmente con la concentración del analito, generalmente debido a efectos de saturación en el sistema de

detección. El rango dinámico lineal, en cambio, es la parte de la curva donde la relación entre la concentración y la señal sigue un modelo lineal con una buena correlación. Este intervalo generalmente comienza en el LC y termina antes de que la curva se desvíe de la linealidad.

En inmunoensayos y sensores, se prefiere trabajar dentro del rango dinámico lineal, porque en este intervalo la concentración del analito se puede calcular con menor error. Sin embargo, en curvas de calibración que no contienen un comportamiento lineal, como ser el caso de las curvas sigmoideas, se ha establecido que el LD se encuentra entre el 80 al 90 % de la máxima señal, mientras que la sensibilidad de la curva de calibración lo determina el  $IC_{50\%}$ . La relevancia de una curva de calibración y de un sensor e inmunosensor radica en la sensibilidad.



**Figura 24.** Rangos dinámicos totales y lineales en las curvas de calibración estándar obtenidas comúnmente en inmunosensores.



# Metodología experimental

## 12. Reactivos

Para la síntesis de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe, como fuente del precursor metálico  $\text{Cd}^{2+}$  se utilizó acetato de cadmio dihidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), Anedra, con un grado de pureza de 98%; como fuente de seleniuro se utilizó polvo de selenio (Se), Sigma-Aldrich, con un grado de pureza de 99,99%. Para la reducción de seleniuro se utilizó borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), Merck, con un grado de pureza de 98%. Para el capping estabilizante y de recubrimiento de los puntos cuánticos de CdSe, se empleó el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$ ), Sigma Aldrich, con grado de pureza de 99,0%, calidad HPLC, y ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), Sigma-Aldrich, con grado de pureza de 99,0%. Para ajustar el pH de los precursores de las síntesis realizadas, se utilizó hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), Sigma-Aldrich, con un grado de pureza de 98%.

Para la formación de las heteroestructuras conjugadas de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, se sintetizó g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a partir de urea ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ), J.T. Baker, con un grado de pureza de 99,7%. Para la exfoliación del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se utilizó ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Sigma-Aldrich, con grado de pureza 95%. Las heteroestructuras conjugadas, así como los puntos cuánticos de CdSe y el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se purificaron mediante el método de precipitación por cambio de polaridad del medio utilizando alcohol etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), Cicarelli, con grado de pureza 99,5 %. Todas las síntesis se realizaron utilizando agua bidestilada.

Para las mediciones y pruebas de bioconjugación e inmovilización en superficies electródicas, se utilizó albumina sérica bovina (BSA), Fedesasa, con grado de pureza del 98% a base seca, y humedad de 5,0%; la inmovilización de la BSA se realizó con glutaraldehído (GLU) 25% V/V en agua ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ), Sigma Aldrich. Las soluciones tampón se prepararon con di-Sodio hidrogeno fosfato dihidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, con grado de pureza de 99,5%; fosfato dihidrógeno de potasio monohidrato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Merck, con grado de pureza de 99,0%; ácido cítrico anhidro ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ), Sigma Aldrich, con grado de pureza de 99,5%; carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Cicarelli, con porcentaje de pureza de 98%. Todas las soluciones se prepararon con agua bidestilada.

Las mediciones de EQL se llevaron a cabo tanto para la región catódica, como para la región anódica. Como coreactante para los estudios de EQL en la región catódica, se

utilizó persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ), Sigma Aldrich, con grado de pureza de 99,995%. Como electrolito de soporte se utilizó una solución tampón de fosfatos 0,1 M, pH 7,0 a partir de  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$  y  $KH_2PO_4 \times H_2O$ . El pH se reguló con una solución alcalina 0,1 M de hidróxido de sodio (NaOH), Sigma-Aldrich, con un grado de pureza de 98%. Para las mediciones de EQL en la región anódica se utilizó como coreactante tripropilamina (TPrA,  $(CH_3CH_2CH_2)_3N$ ), Sigma-Aldrich, con grado de pureza de 98%. Como electrolito de soporte para los estudios con TPrA se utilizó una solución tampón 0,1 M de Tris amonio – ácido clorhídrico (Tris - HCl), preparada a partir de Tris(hidroximetil) - aminometano ( $NH_2C(CH_2OH)_3$ ), Sigma-Aldrich, con grado de pureza de 99,9%. El pH de la solución se reguló a 7,4 con una solución de ácido clorhídrico (HCl), Health Hazard, con grado de pureza 36,5-38%. Todas las soluciones se prepararon con agua bidestilada.

Para el inmunosensor, se utilizó STE, marca Sigma-Aldrich con grado de pureza  $\geq 98\%$ . Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti STE (mAb-STE), Santa Cruz Biotechnology de concentración 5 mg/mL. Para la síntesis de la STE hemiacetal (STE-OH), como medio de reacción, se utilizó acetona, Cicarelli, con grado de pureza del 99,5 %. Para la extracción del hemiacetal formado y purificación cromatográfica, se utilizó cloroformo, Sigma-Aldrich, con grado de pureza  $\geq 99,5\%$ ; sulfato de sodio anhidro ( $Na_2SO_4$ ), Sigma-Aldrich, con porcentaje de pureza  $\geq 99,8\%$ . silica gel 60 (0,040-0,063 mm), Merck, de calidad analítica para columnas cromatográficas.

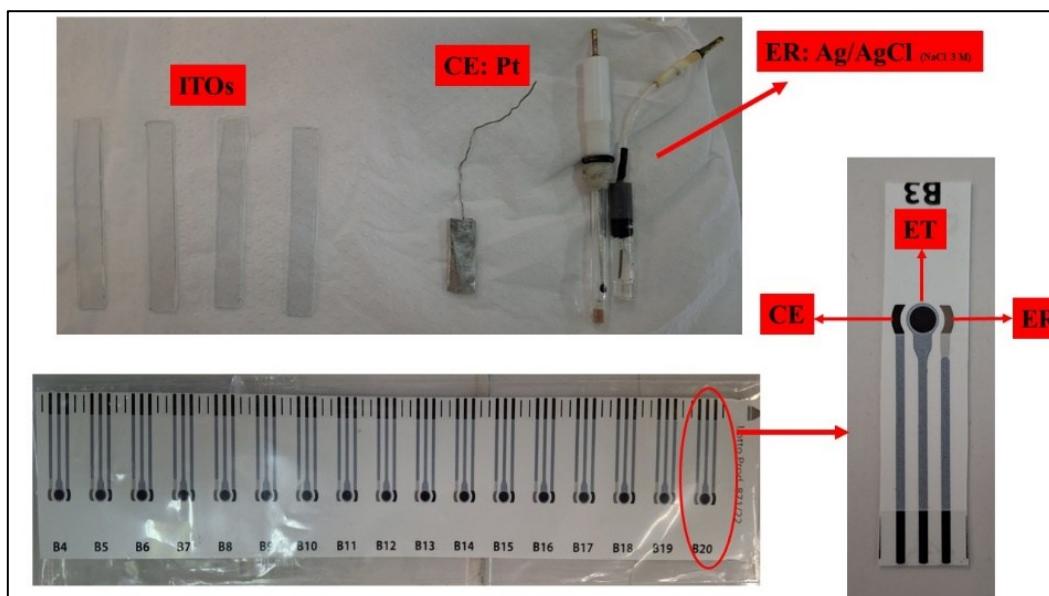
La síntesis del bioconjugado STE@CdSe se llevó a cabo en varias etapas. Para la conjugación del QDs MPA/MES CdSe, se utilizó L-lisina monoclóridato ( $C_6H_{15}N_2ClO_2$ ), Merck, con grado de pureza  $\geq 98,0\%$ . Como medio de reacción se utilizó una solución tampón borato 0,1 M pH 8,8 a partir de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), J.T. Baker, con grado de pureza de 99,5%; borato de sodio decahidratado ( $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$ ), Cicarelli, con grado de pureza de 99,8%. Para la unión del aminoácido con los grupos del capping del QD de CdSe, se utilizó glutaraldehído ( $C_5O_2H_8$ ), Sigma-Aldrich, con concentración 25 % V/V

Para la inmovilización de los mAb-STE en la superficie eléctrica tampón se utilizaron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC,  $C_8H_{17}N_3$ ), Sigma-Aldrich, con porcentaje de pureza  $\geq 98,0\%$ , y N-Hidroxisuccinimida (NHS,  $C_4H_5NO_3$ ), Merck, con pureza de 98%.

Para la preparación de la muestra de maíz, se utilizó maíz estéril previamente molido. Para las mediciones por HPLC, se purificó la muestra con una columna de fase sólida Strata X, con una fase móvil de acetonitrilo y metanol calidad HPLC.

### 13. Electrodos

Para las mediciones de EQL en la región catódica, así como también para los estudios de caracterización electroquímica de los puntos cuánticos de CdSe y las heteroestructuras conjugadas de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en medio acuoso, se utilizaron electrodos impresos de carbono (EIC) modelo ItalSens, adquiridos en PalmSens. El EIC consiste en una superficie hidrofóbica de poliéster de dimensiones 8 mm x 30 mm, el cual contiene los tres electrodos, siendo el ET de carbono, de 3 mm de diámetro; el CE también de carbono; y el electrodo de pseudo-referencia es de plata. Los EIC utilizados se muestran en la Figura 25.



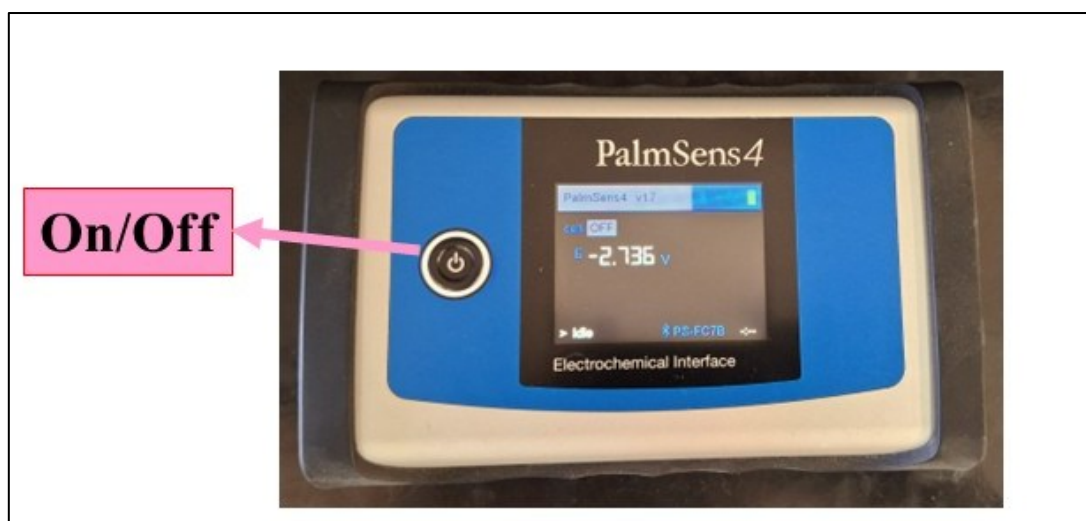
**Figura 25.** Electrodos ITOs, contra electrodo de platino (CE: Pt) y electrodos de referencia comerciales de Ag/AgCl en NaCl 3M (Arriba); electrodos impresos de carbono (EIC) comerciales de la marca PalmSens utilizados en los estudios EQL catódicos (Abajo).

Para los estudios de EQL en la región anódica, el inmunosensor y la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , así como también la caracterización electroquímica en medio orgánico de los puntos cuánticos de CdSe y las heteroestructuras conjugadas de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, se utilizaron electrodos de trabajo (ET) de vidrio pasivados con óxido de indio y estaño (ITO), Delta Technologies Ltd., de superficie 7,0 x 5,0 x 0,7 mm, con una resistencia de 8 – 12 Ohm; como contra electrodo (CE) se utilizó un electrodo de platino (Pt) y como electrodo de referencia (ER) se utilizó un electrodo de Ag/AgCl (NaCl 3 M). Los ITO utilizados, así como también el CE y ER se muestran en la Figura 25.

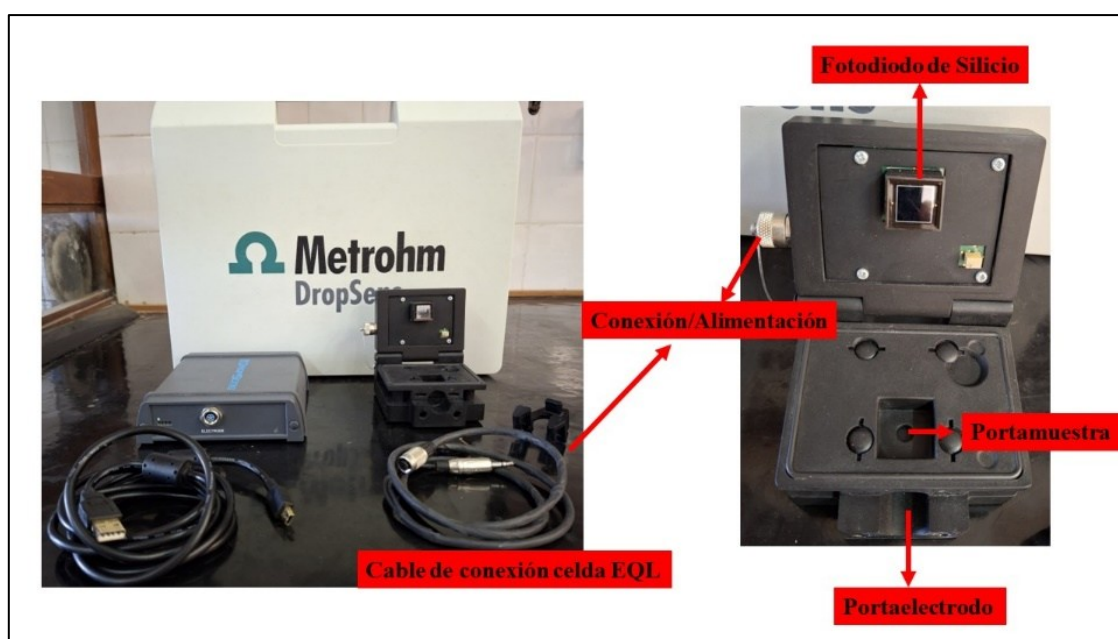
#### **14. Potenciostatos**

Un potenciostato es un dispositivo electrónico que permite controlar y medir el potencial eléctrico aplicado al ET con respecto al ER, mientras mide la corriente que fluye entre el ET y el CE. Su principal función es manejar el potencial del sistema electroquímico según la función de potencial aplicada, lo que permite estudiar procesos de transferencia de electrones y fenómenos redox con alta precisión. A continuación, se describen los dos equipos de medición electroquímica empleados en este estudio doctoral. Se utilizó un potenciostato/galvanostato PalmSens 4, equipado con un módulo de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés). Para las mediciones electroquímicas, el equipo se acopló a un ordenador con el software PSTrace 5.10. La Figura 26 muestra el potenciostato PalmSens 4 utilizado. Este potenciostato fue acoplado al correspondiente espectrofluorómetro para realizar las medidas de EQL usando como electrodo de trabajo un ITO.

Para las medidas de EQL usando EIC, se utilizó el bipotenciostato/galvanostato uStat ECL, de DropSens. Cuenta con un fotodetector de silicio adecuado para realizar estudios de EQL con electrodos serigrafiados acoplado a una celda electroquímica que opera con volúmenes de solución inferiores a 50  $\mu\text{L}$ . Su uso es ideal para aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos y luminiscentes. El equipo se utilizó acoplado a una ordenadora con el software DropView 8400, permitiendo el detallado de datos en tiempo real. La Figura 27 describe los componentes del equipo descrito previamente.



**Figura 26.** Potenciostato/galvanostato PalmSens 4.



**Figura 27.** Equipo bipotenciostato/galvanostato uStat ECL de DropSens con todos sus accesorios (izquierda); componentes de la celda de medición EQL (derecha).

## 15. Equipos de medición óptica

Para las mediciones de los espectros de absorción se utilizó un espectrofotómetro HP Agilent Cary 8454 UV-visible, el cual consiste en un instrumento de detección óptica con detector de arreglo de diodos que permite la adquisición rápida y simultánea de espectros en el rango de 190 nm a 1100 nm, con una resolución espectral de aproximadamente 1 nm.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron utilizando un espectrofluorómetro FluoroMax plus, Horiba. Este espectrofluorómetro permite mediciones precisas de fluorescencia en muestras líquidas y sólidas, con un rango espectral de 200 nm a 1550 nm, dependiendo de los detectores y accesorios. Consta de una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación y monocromadores con rejillas holográficas para minimizar la luz parásita, ofreciendo una resolución espectral de hasta 0,1 nm en excitación y emisión.

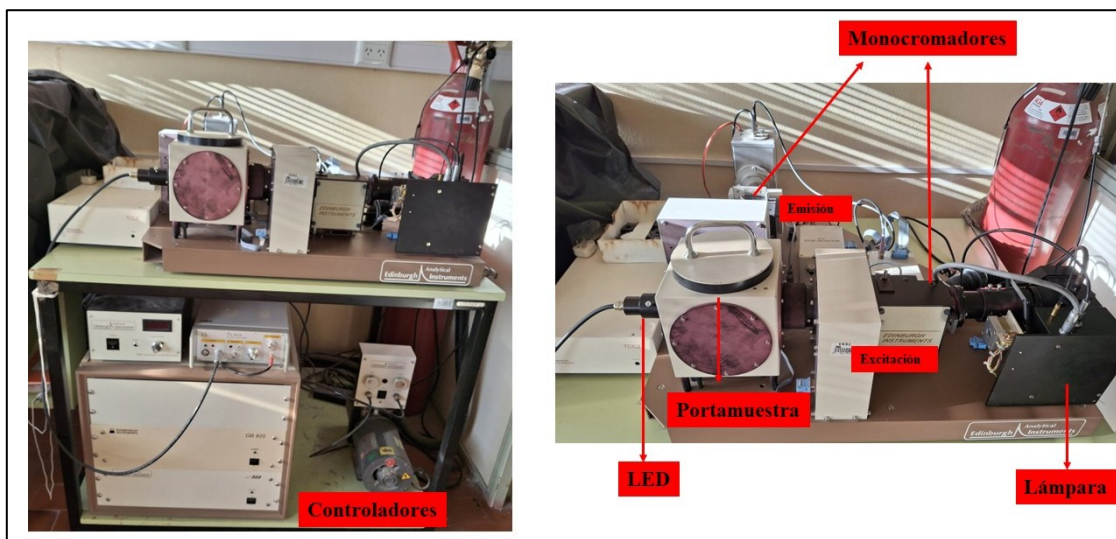
Ambos equipos, tanto el espectrofotómetro como el espectrofluorómetro fueron utilizados acoplados a un ordenador con los softwares OpenLab ECM y FluorEssence™. Los equipos de medición óptica descritos previamente se muestran en la Figura 28.



**Figura 28.** Equipos utilizados en los estudios de caracterización óptica: espectrofluorómetro (izquierda) y espectrofotómetro (derecha).

Para las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo se utilizó la técnica de conteo de fotón único, con un equipo Edinburgh Instruments OB900. Este equipo permitió el estudio de los tiempos de vida de fluorescencia, utilizando leds como fuente de excitación.

El método de detección es el recuento de fotones individuales correlacionados con el tiempo mediante una placa de microcanales. Permite determinar los tiempos de vida en un rango de tiempo desde los nanosegundos a los milisegundos. La Figura 29 representa el equipo de detección de fluorescencia resuelta en el tiempo utilizado en este estudio.



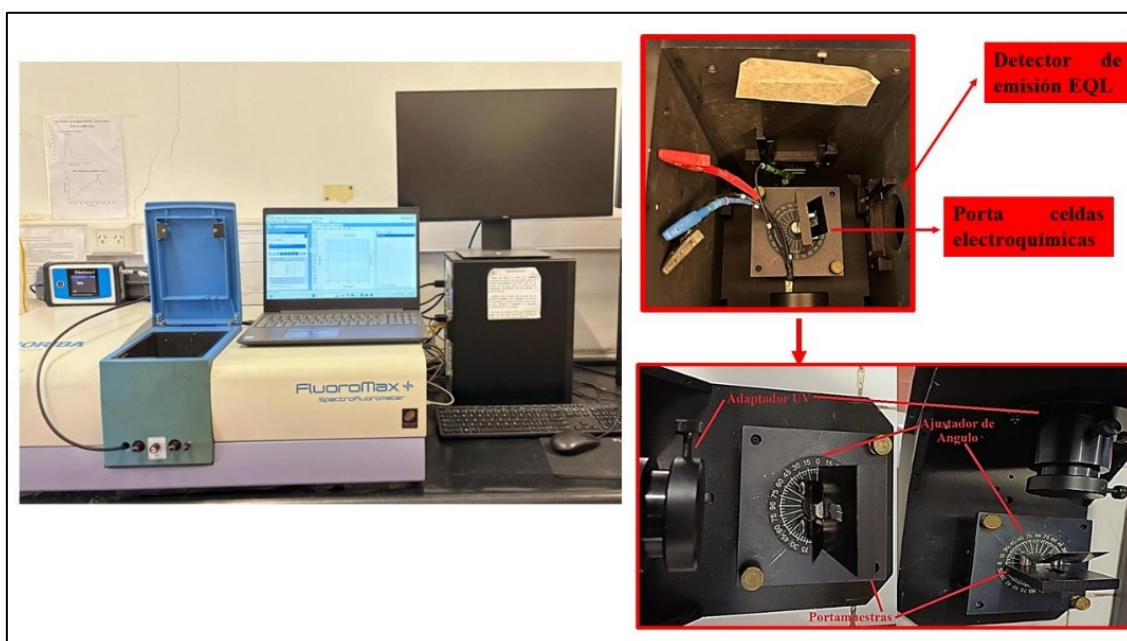
**Figura 29.** Equipo de conteo de fotones individuales (SPC) con sus accesorios.

### 15.1. Medición de electroquimioluminiscencia anódica

El acoplamiento de un fluorómetro con un potenciostato en estudios de EQL es una estrategia fundamental para correlacionar los procesos electroquímicos con la emisión generada por especies excitadas. Mientras que el potenciostato controla el potencial aplicado al electrodo de trabajo y permite inducir reacciones redox que generan estados excitados, el fluorómetro, equipado con un detector de alta sensibilidad, mide la intensidad de la luz emitida. Este acoplamiento es altamente viable, ya que la emisión de EQL ocurre en la interfaz electrodo - solución y puede registrarse en tiempo real mientras se modula el potencial aplicado. Además, el uso simultáneo de ambos equipos permite obtener información detallada sobre los mecanismos de transferencia electroquimioluminiscentes, eficiencia cuántica y estabilidad de los emisores, aspectos clave en el desarrollo de sensores. La integración de estos sistemas, optimizando la geometría de la celda y la alineación del detector con la zona de emisión, permite mediciones reproducibles y sensibles.

Para los estudios de EQL en la región anódica, así como también para la detección de la micotoxina STE en el inmunosensor desarrollado, se utilizó el sistema de acople del potenciostato/galvanostato PalmSens 4 con el espectrofluorómetro FluoroMax plus, Horiba previamente descritos en las secciones anteriores.

La Figura 30 muestra el sistema de acople del espectrofluorómetro y potenciostato implementado para la detección de STE mediante EQL del inmunosensor desarrollado, como así también para el sensor desarrollado para la detección de  $H_2O_2$ .



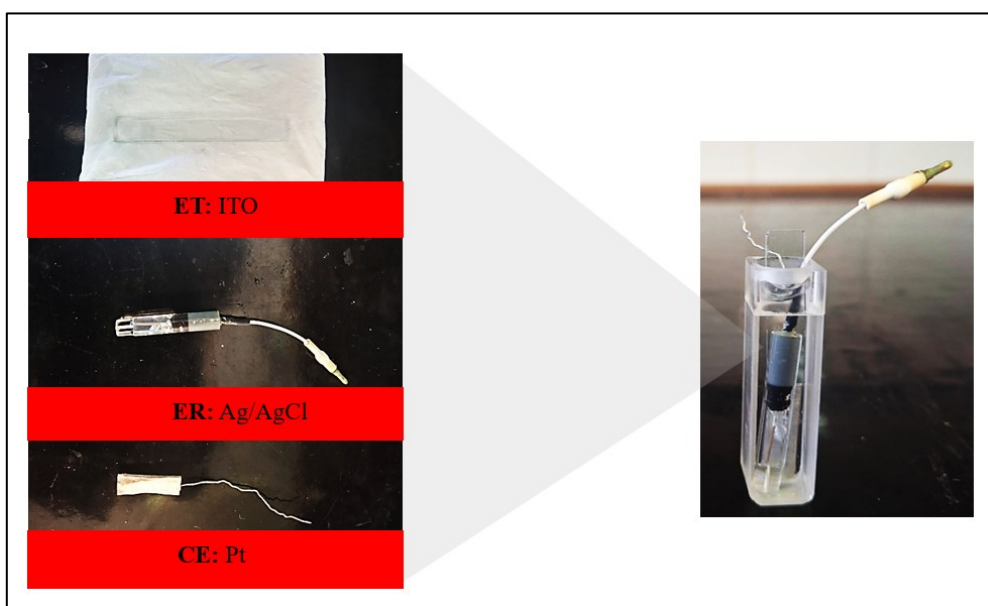
**Figura 30.** Dispositivo de acoplamiento espectrofluorómetro - potenciostato diseñado para las lecturas de electroquimioluminiscencia anódica (izquierda); configuración porta celda y detector de la emisión luminiscente electrogenerada (derecha).

La configuración del dispositivo acoplado consistió en generar la excitación electroquímica a través del potenciostato, razón por la cual se bloqueó la ranura de salida de luz proveniente del monocromador de excitación, de manera de evitar que la luz de la lámpara del espectrofluorómetro interviniese en la excitación de las especies en solución. De esta manera, la luz recolectada por el monocromador de emisión perteneció a los procesos generados a través de las reacciones de óxido/reducción del sistema.

Para garantizar las condiciones óptimas de detección de la EQL, se utilizó una porta celda rotacional gradual (Figura 30 derecha, abajo) que permitió orientar la cara conductora de los electrodos ITOs hacia el detector de emisión garantizando la mayor detección luminiscente.

#### 15.1.1. Celda de electroquimioluminiscencia

El arreglo de la celda utilizada para los estudios de EQL anódica para la detección de STE y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se muestra en la Figura 31. La configuración de la celda consistió en una cubeta de cuarzo conteniendo un arreglo de tres electrodos, en donde el electrodo de trabajo (ET) (ITO) se ubicó en el extremo derecho de la celda; el electrodo de referencia (ER) de Ag/AgCl en el centro de la celda, lo que permitió que tanto el electrodo de trabajo como el contraelectrodo no tuviesen contacto, y el contraelectrodo (CE) de platino (Pt) en el extremo opuesto del ITO. Para mantener fijos los electrodos se utilizó un tapón de teflón ajustado al arreglo descrito para este sistema.



**Figura 31.** Celda electroquímica utilizada para los experimentos de electroquimioluminiscencia anódica.

## **15.2. Equipos para la caracterización y morfología de los materiales**

La caracterización de la estructura química de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR); para ello se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo Bruker Tensor 27 FT-IR, donde las soluciones se depositaron en una celda de KBr libre de humedad. La morfología de la superficie de los nanomateriales sintetizados y conjugados se realizó mediante la técnica de TEM, utilizando un Microscopio electrónico de Transmisión JEOL Ltd. JEM-1400 Flash operando a 120 kV.

## **15.3. Cromatografía líquida de alta resolución**

Un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es un sistema analítico diseñado para la separación, identificación y cuantificación de compuestos en una mezcla. Funciona bombeando una fase móvil (solvente) a alta presión a través de una columna empacada con una fase estacionaria, donde los analitos se separan en función del equilibrio de partición entre las fases móvil y sólida. Como técnica de validación de las respuestas obtenidas en la detección de STE con el inmunosensor diseñado, se utilizó la metodología HPLC.

Las medidas cromatográficas fueron realizadas con un HPLC marca Waters Alliance e2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba y un autoinyector, acoplado a un detector de arreglo de diodos (Waters 2998). Se empleó una columna C18 de fase reversa Phenomenex Luna 00G-4252-E0 con diámetro de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å, la que posee una longitud de 250 mm y diámetro interno de 4,6 mm. Además, se utilizó una pre-columna SecurityGuard AJ0-4287 C18 de fase reversa de 4 mm de longitud y 3 mm de diámetro interno, en un soporte modelo KJ0-4282. El equipo HPLC y la columna C18 se muestran en la Figura 32.

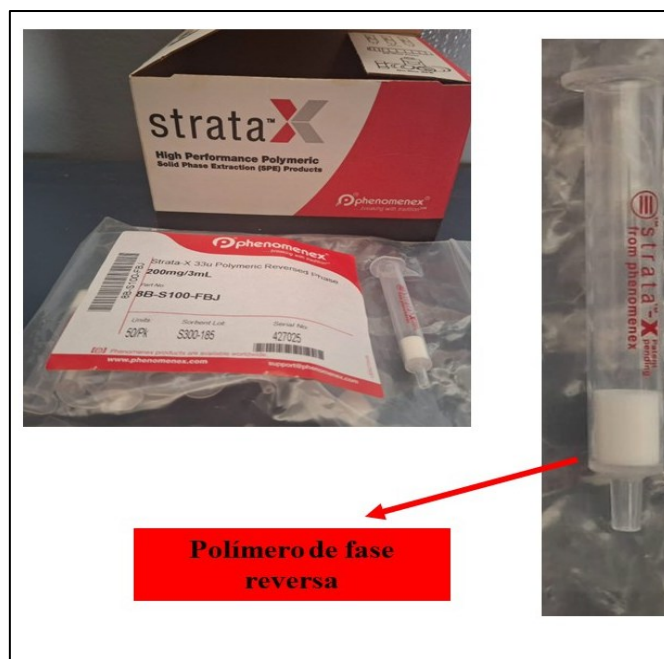


**Figura 32.** Cromatógrafo Waters Alliance e2695 Separation Module (izquierda); columna Phenomenex Luna 00G-4252-E0 (derecha).

### 15.3.1. Columnas de extracción de fase solida

Las columnas de extracción de fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) son dispositivos utilizados para la purificación y preconcentración de analitos en muestras líquidas antes de su análisis. Funcionan mediante la retención selectiva de compuestos en una fase estacionaria contenida en la columna, mientras que las impurezas se eliminan por elución con una fase móvil adecuada. Posteriormente, los analitos de interés se eluyen para su análisis por técnicas como HPLC.

Para la detección de STE por HPLC, se purificó la muestra previamente; para ello se utilizaron columnas comerciales Strata-X poliméricas de fase reversa (Phenomenex). Estas columnas son utilizadas para moléculas con peso molecular  $<10$  kDa, e ideales para compuestos neutros y con grupos aromáticos. Tienen como mecanismo de retención para la purificación de analitos interacciones hidrofóbicas, las interacciones dipolo – dipolo, formación de enlaces de hidrogeno. La Figura 33 muestra las columnas utilizadas para la purificación y concentración de STE.



**Figura 33.** Columna polimérica de fase reversa Strata-X utilizadas para la detección de STE en muestras de maíz.

## 16. Técnicas y procedimientos

En esta sección se dará detalle de las técnicas empleadas para la caracterización de los nanomateriales, bioconjugado y detección de la STE en el inmunosensor electroquimioluminiscente, así como también los estudios de las condiciones óptimas ópticas, electroquímicas y de EQL. Se describen, además, las síntesis y desarrollo de todas las nanoestructuras, el bioconjugado STE y la preparación de las soluciones de estudio.

Dentro de las metodologías utilizadas en este trabajo de tesis doctoral, para la caracterización de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe, el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, las heteroestructuras conjugadas de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, el bioconjugado CdSe@STE y la modificación de la superficie electródica, se utilizaron técnicas electroquímicas convencionales como la voltamperometría cíclica<sup>247,248</sup> como técnica de exploración para analizar el comportamiento redox de los nanomateriales sintetizados; la cronoamperometría<sup>249,250</sup>, que se utilizó para el análisis de las superficies electródicas<sup>251</sup> modificadas así como también el estudio en el tiempo de los procesos de oxidación y reducción de los nanomateriales y el inmunosensor final<sup>252</sup>. Para la caracterización óptica de los nanomateriales y el

bioconjugado, se utilizaron la espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de fluorescencia y el recuento de fotones individuales correlacionados con el tiempo.

### 16.1. Espectroscopia UV-visible

Por medio de los espectros de absorción fue posible obtener la energía de banda prohibida ( $E_g$ ), teniendo en cuenta la absorción de radiación de los nanomateriales a cada longitud de onda. Para la caracterización del  $E_g$  óptico se utilizó la ecuación de Tauc<sup>253</sup> que se muestra a continuación:

$$\alpha h\nu = C(h\nu - E_g)^n \quad (28)$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de absorción de la muestra definido como el cociente de la absorbancia y el paso óptico ( $A/L$ ),  $h$  es la constante de Planck,  $C$  es una constante de proporcionalidad la cual es el resultado del proceso algorítmico con un valor de 2,303 en unidades adimensionales y  $\nu$  es la frecuencia de la longitud de onda analizada. El valor de  $n$  representa la transición electrónica del QD, las cuales pueden ser directas o indirectas<sup>254,255</sup>. Para sistemas en donde los electrones transferidos no sufren caídas en orbitales vibracionales se considera una transición directa teniendo un valor de  $n = 2$ , mientras que para sistemas en donde la trayectoria electrónica decae en los estados trampa, el valor de  $n = 1/2$ .

Para el cálculo de  $E_g$  se realizó un gráfico de  $h\nu$  vs.  $(\text{Abs} \times h\nu)^n$ ; al extrapolar la parte lineal de la curva con el eje de las abscisas se obtuvo el valor  $E_g$ .

### 16.2. Espectroscopia de fluorescencia

Dentro de las utilidades que ofrece la emisión de fluorescencia, se pudo determinar la energía mínima del estado singlete ( $E_{0-0}$ ). Este parámetro corresponde a la diferencia energética entre el nivel vibracional más bajo del estado electrónico fundamental (generalmente asociado a la banda de valencia, BV) y el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado (asociado a la banda de conducción, BC). En términos físicos,  $E_{0-0}$  representa la energía mínima requerida para promover un electrón desde el estado

fundamental hasta el estado excitado sin contribución vibracional adicional. Esta energía se obtuvo experimentalmente a partir de espectros de excitación y fluorescencia; el valor de la  $E_{0-0}$  se aproxima al punto donde se cruzan los espectros de absorción y fluorescencia. El valor de la  $E_{0-0}$  expresado en unidades de energía (eV) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{0-0} = \frac{h\nu}{\lambda} = \frac{1240 \text{ (eV} \times \text{nm)}}{\lambda_{\text{cruce}}(\text{nm})} \quad (29)$$

el valor 1240 se corresponde a la constante de Planck  $h$  multiplicada por la velocidad de la luz  $\nu$ , ambas en unidades de energía (eV).

Además, la medición de la emisión de intensidad de fluorescencia proporcionó detalles sobre la eficiencia cuántica, las tasas de recombinación y la dinámica de excitación de los nanomateriales, ofreciendo una comprensión profunda de sus características fundamentales.

### 16.3. Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

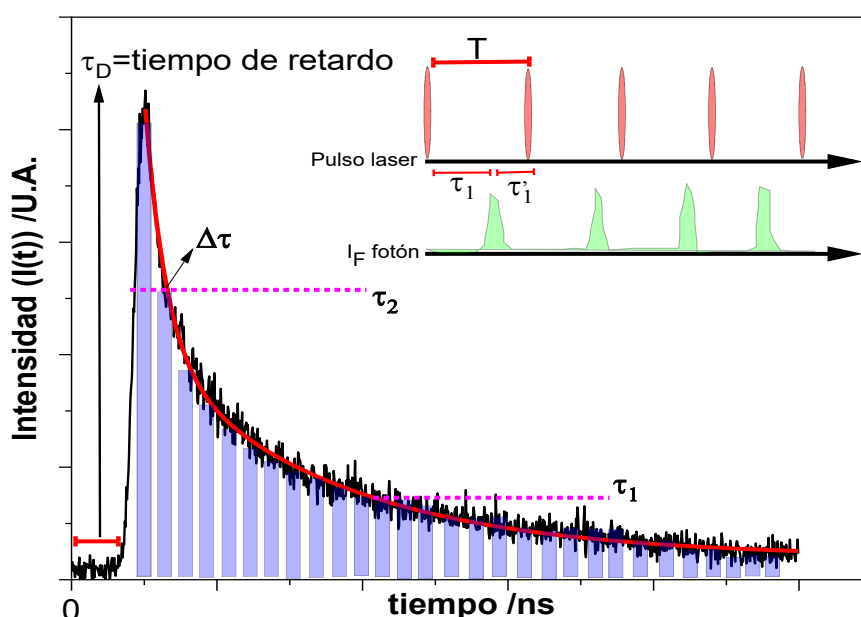
La espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo permite el estudio de procesos dinámicos en materiales o compuestos por medio de determinaciones de intensidades de fluorescencia (cuentas) en función del tiempo. Un detector ultrasensible, como un fotomultiplicador (PMT) o un detector de avalancha de fotos individuales (SPAD), registra cada fotón emitido con una resolución temporal precisa. El tiempo de llegada de cada fotón se mide en relación con el pulso de excitación, generando un histograma de decaimiento de intensidad. A partir de este análisis, se obtuvieron los tiempos de vida de fluorescencia, información clave para estudiar procesos de transferencia de energía, estados excitados en nanomateriales, interacciones biomoleculares y dinámica de fluorescencia en sistemas conjugados. La curva de decaimiento de la intensidad de fluorescencia es el resultado de un gran número de recuentos de fotones. Con el fin de no considerar el aporte de la señal de excitación, la función obtenida de la muestra debe ser corregida (deconvolucionada). El perfil temporal de los pulsos de excitación es registrado bajo las mismas condiciones reemplazando la muestra con una solución dispersante de luz, por ejemplo, Ludox o una dispersión de silica. La Figura 34 ejemplifica el

decaimiento de la intensidad de fluorescencia para un nanomaterial luminiscente, así como también de determinación de los tiempos de vida y el principio experimental de la técnica TCSPC.

En todos los casos, los decaimientos de la fluorescencia se ajustaron correctamente con la ecuación biexponencial:

$$I(t) = \beta_1 \exp(-t/\tau_1) + \beta_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (30)$$

donde  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , son los factores preexponenciales.



**Figura 34.** Diagrama esquemático de una curva típica de decaimiento de intensidad de fluorescencia: la gráfica representa el recuento estadístico de los tiempos de fotones individuales para construir curvas de tiempo de vida de fluorescencia. Inserto: Principio del registro del tiempo de la tarjeta TCSPC.

#### 16.4. Emisión de luminiscencia electrogenerada

La EQL puede representarse como la variación de la intensidad de emisión de luz en función del tiempo ( $I_{EQL}$  vs  $t$ ) y en función de la energía emitida por el luminóforo responsable de la EQL ( $I_{EQL}$  vs  $\lambda$ )<sup>256</sup>.

#### **16.4.1. Electroquimioluminiscencia en función del potencial**

La EQL, al ser un proceso relacionado directamente con los procesos de oxidación y reducción de especies químicas, se puede cuantificar con relación a la variación o barrido de potencial aplicado en un sistema electroquimioluminiscente. Este método se conoce como voltamperometría cíclica de EQL (VC - EQL); es una técnica combinada que permite estudiar los procesos electroquímicos responsables de la emisión mediante un barrido cíclico de potencial. En esta técnica, la señal electroquimioluminiscente se mide simultáneamente con la corriente electroquímica, proporcionando información sobre los mecanismos redox, la eficiencia luminosa y la estabilidad del sistema. A partir de la VC – EQL se puede obtener:

- A. Potenciales de inicio y máximo de EQL: permiten identificar los potenciales óptimos para la generación de luminiscencia.
- B. Comparación de los picos de corriente y EQL: confirma la relación entre procesos redox y emisión luminiscente.
- C. Eficiencia de emisión: se evalúa la intensidad máxima de EQL respecto a la corriente generada.
- D. Estabilidad y reversibilidad: se analizan múltiples ciclos voltamperométricos para evaluar la estabilidad del sistema.

#### **16.4.2. Electroquimioluminiscencia en función del tiempo**

Otra de las metodologías para la generación y cuantificación de la EQL, es teniendo en cuenta su variación en función de un potencial aplicado al sistema, ya sea anódico o catódico. Se utiliza como técnica electroquímica la cronoamperometría<sup>257</sup>. En este procedimiento, se observa como la EQL decae exponencialmente con el incremento del tiempo cuando se aplica un potencial que involucre la formación de las especies químicas radicalarias tanto del coreactante como del emisor. El decaimiento de la emisión se corresponde con la disminución de la corriente faradaica del proceso, debido a que los reactivos se consumen en cercanías del electrodo, y la señal dependerá de su difusión desde el seno de la solución. Por otro lado, tiempos largos de medición favorecen la formación de productos provenientes de las especies radicalarias de los coreactantes o los

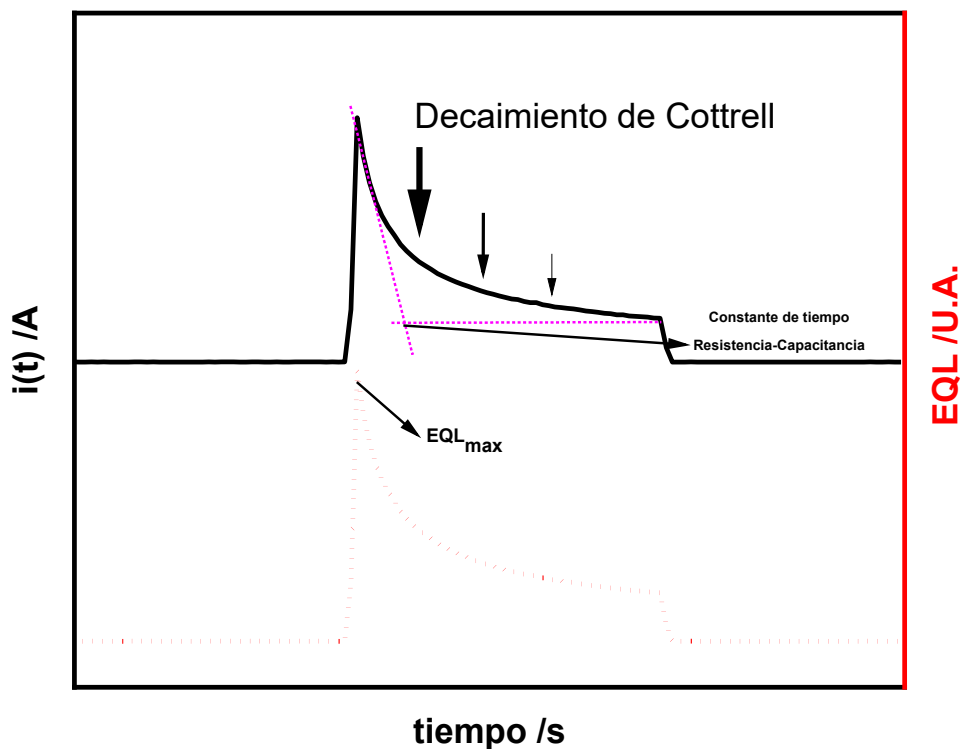
mismos emisores, ocasionando reacciones no deseadas, como así también pueden generar especies adsorbidas sobre el electrodo, afectando su área y capacidad electrocatalítica, y así disminuyendo la emisión de luz. Mantener un potencial aplicado por tiempos prolongados puede aumentar la corriente de fondo y el ruido en la medición, reduciendo la sensibilidad y la relación señal/ruido en la detección de EQL<sup>258</sup>.

En la cronoamperometría, la corriente está directamente relacionada con la difusión de las especies electroactivas (dentro de las cuales se encuentran la especie emisora y el coreactante) desde el seno de la solución hacia la interfaz electrodo - solución, y sigue la ecuación de Cottrell<sup>259</sup> en sistemas controlados por difusión; la ecuación que describe este comportamiento es:

$$i(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}c_0}{\pi^{1/2}} \times \frac{1}{\sqrt{t}} \quad (31)$$

siendo  $n$  el número de electrones transferidos en la reacción,  $F$  es la constante de Faraday (96484 C/mol),  $D_0$  el coeficiente de difusión de la especie electroactiva ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $c_0$  es la concentración inicial,  $A$  es el área electroactiva del electrodo, y  $t$  es el tiempo transcurrido después de aplicar el potencial. Los perfiles típicos de un sistema electroquimioluminiscente controlado por difusión y medido experimentalmente por cronoamperometría se muestra en la Figura 35.

De acuerdo con lo anteriormente explicado, es posible medir experimentalmente la EQL a distintos potenciales y tiempos de detección; esto permite controlar la emisión bajo diferentes perturbaciones de potencial, útil en sistemas como inmunosensores. La técnica de cronoamperometría de pasos múltiples (MultiStep Amperometry, en inglés) se utiliza en la medición de EQL en inmunosensores para generar señales lumínicas controladas mediante la aplicación secuencial de potenciales específicos. Para los estudios de EQL anódica y detección de STE, se utilizó como técnica de excitación electroquímica la cronoamperometría de pasos múltiples, mientras que la técnica de detección de EQL fue la fluorescencia en modo cinético. Para la medición EQL se utilizó el acople de los dispositivos PalmSens – FluoroMax Plus descrito previamente.



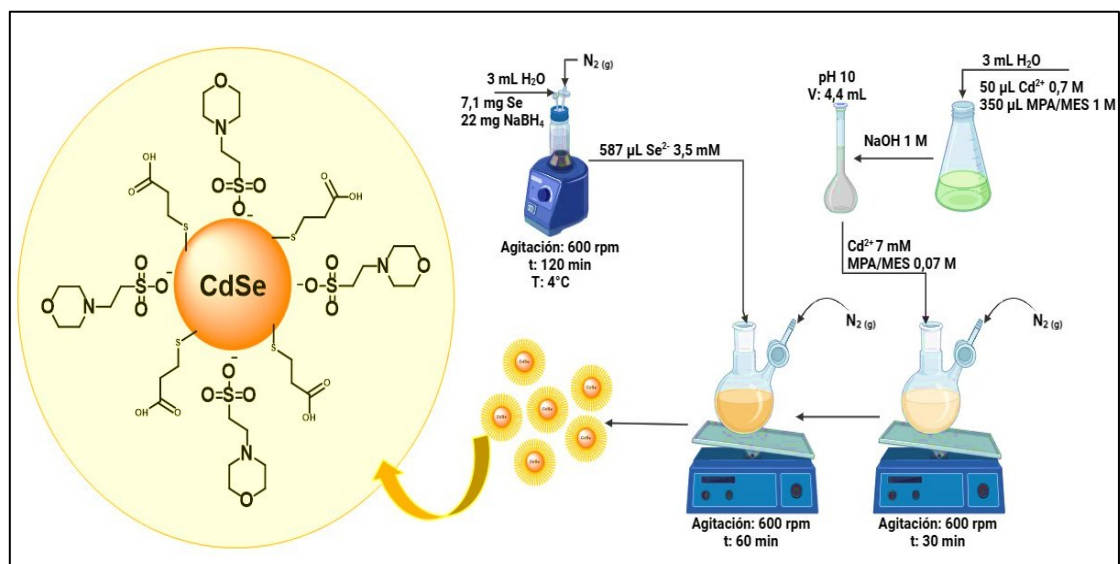
**Figura 35.** Transientes de corriente (-) y EQL (--) para un sistema controlado por difusión. Respuesta típica para una medición EQL mediante la excitación electroquímica por cronoamperometría.

En estos sistemas, la EQL se genera al aplicar un potencial que induce la oxidación/reducción del luminóforo y coreactante, generando especies excitadas que emiten luz. Posteriormente, se aplica un potencial de reposo (potencial de equilibrio) para regenerar el sistema y evitar el agotamiento de los reactivos. Este ciclo de activación reposo define el comportamiento ON - OFF de la EQL, donde ON corresponde al período en el que se genera la señal luminosa y OFF al tiempo de reposo en el que no hay emisión.

Es importante destacar que para que las medidas de EQL sean precisas y correlacionadas entre ambas respuestas, corriente y emisión de luminiscencia, el tiempo de medida entre cada intervalo de lectura, tiempo de integración y tiempo de lectura de la medición, deben ser iguales tanto en la metodología electroquímica como en la detección cinética luminiscente.

### 16.5. Síntesis de puntos cuánticos CdSe

Los QD de CdSe se sintetizaron tal y como se describe a continuación. Se prepararon 4 soluciones de QDs de CdSe, cada una con volúmenes finales de 5 mL, en las cuales las concentraciones de los precursores de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Se}^{2-}$  fueron 7 mM y 3,5 mM respectivamente. Para obtener QD solubles en medio acuoso, se sintetizaron con un recubrimiento formado por ácido 3-mercaptopropionico y ácido n-morfolino etanosulfónico (MPA/MES). Se sintetizaron QDs con diferentes concentraciones de estabilizantes. Una relación molar de 2 moles de selenio por cada mol de cadmio fue la relación molar ideal para la obtención de puntos cuánticos más estables en solución acuosa, así como también con mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y EQL. La Figura 36 detalla el procedimiento para la síntesis de los QD MPA/MES CdSe.



**Figura 36.** Metodología experimental para la síntesis de QD MPA/MES CdSe (derecha); estructura química de los QDs sintetizados mediante esta técnica (izquierda).

Para la formación de QDs semiconductores MPA/MES CdSe, como primer paso, se preparó una solución de seleniuro a partir de polvo de selenio. Luego, se realizó una reducción del selenio. Así, se formó una solución stock compuesta por 22,0 mg de  $\text{NaBH}_4$  disueltos en 3,0 mL de agua bidestilada conteniendo 7,1 mg de Se. La solución se colocó en agitación a 600 rpm y en constante desgasado con nitrógeno inerte y seco para eliminar el oxígeno presente. La solución de  $\text{Se}^{2-}$  se mantuvo a una temperatura entre  $4^\circ\text{C}$  -  $6^\circ\text{C}$ .

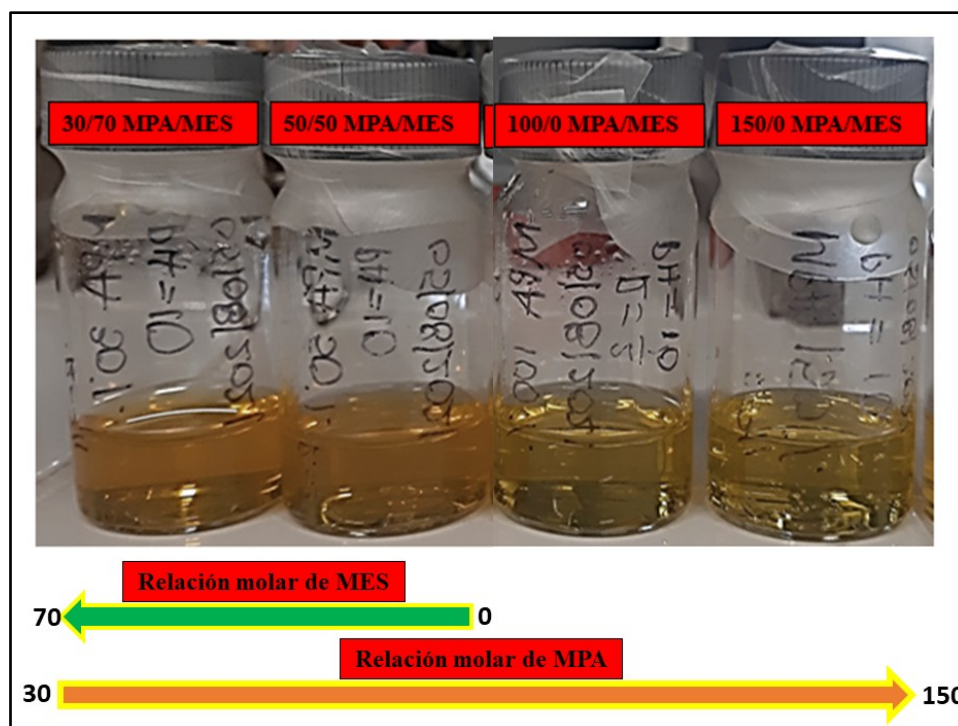
De la solución stock, se utilizaron 590  $\mu\text{L}$  para la formación de cada síntesis de QDs y obtener una concentración final de 0,0035 M de  $\text{Se}^{2-}$ .

Con la finalidad de preparar QDs con diferentes tamaños y propiedades ópticas y electrónicas variables, las relaciones molares de los estabilizantes MPA y MES se variaron en cada síntesis. Se utilizaron 4 relaciones molares de MPA/MES: 30/70, 50/50, 100/0 y 150/0, a una concentración final de 0,07 M. Las soluciones se prepararon mezclando, en un matraz, 3 mL de agua bidestilada de pH 6 y la solución de  $\text{Cd}^{2+}$ , además de las cantidades correspondientes de MPA y MES. La solución se mantuvo un pH 10 adicionando NaOH 1 M para cada relación de MPA/MES, los cuales se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Volúmenes de solución MPA, MES y NaOH utilizados en la preparación de cada síntesis de nanocristales de CdSe.

| <b>Relación molar MPA/MES</b> | <b>MPA/ <math>\mu\text{L}</math></b> | <b>MES/ <math>\mu\text{L}</math></b> | <b>NaOH/ <math>\mu\text{L}</math></b> |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>150/0</b>                  | 525                                  | 0                                    | 490                                   |
| <b>100/0</b>                  | 350                                  | 0                                    | 280                                   |
| <b>50/50</b>                  | 175                                  | 175                                  | 240                                   |
| <b>30/70</b>                  | 105                                  | 245                                  | 300                                   |

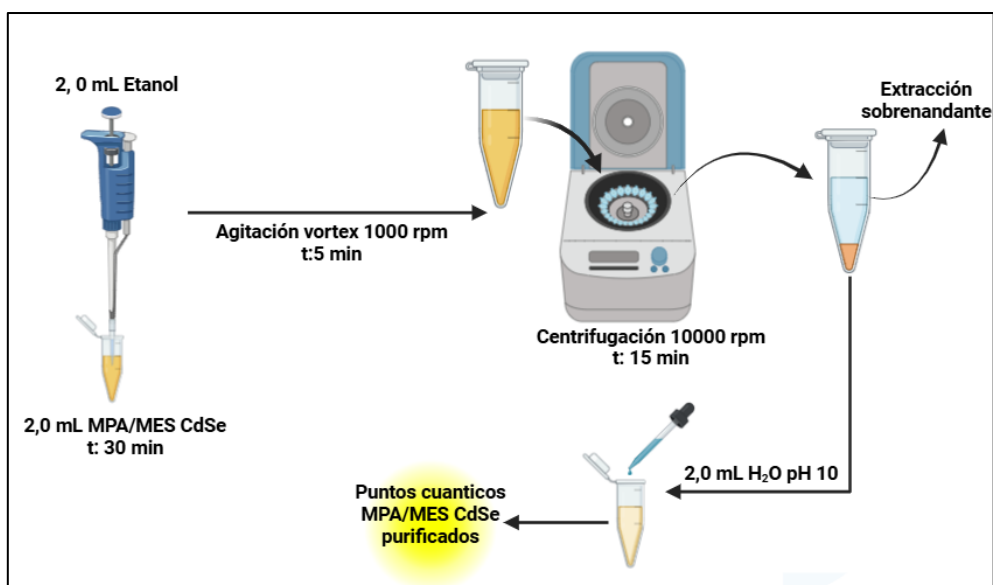
Una vez mezclados el precursor metálico y los agentes estabilizantes MPA/ES, se desgasó durante 30 minutos y se mantuvo en agitación constante a 600 rpm, para luego realizar la inyección de la solución de seleniuro, manteniendo la misma velocidad de agitación y el desgasado durante 60 minutos. A través de esta técnica experimental, se sintetizaron los QD de CdSe con las distintas relaciones molares MPA/MES. Cabe destacar que, en cada síntesis desarrollada, la concentración de MPA/MES fue 10 veces mayor a la concentración de cadmio utilizada. Para la preparación de los stocks MPA y MES, se tomó como referencia arbitraria una concentración de 1 M y las cantidades utilizadas para preparar las mismas fueron de 87  $\mu\text{L}$  de MPA y 195,20 mg de MES. La Figura 37 muestra las síntesis obtenidas siguiendo la metodología previamente descrita.



**Figura 37.** síntesis obtenidas de QD CdSe a diferentes relaciones molares de MPA/MES. Las flechas indican la proporción molar de los estabilizantes MES (verde) y MPA (naranja).

### 16.5.1. Purificación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe

La purificación de QD semiconductores es un procedimiento por medio del cual se busca eliminar impurezas, reactantes residuales, ligandos libres y subproductos de la síntesis. Este proceso se basa en la diferencia de solubilidad de los QDs sintetizados y las impurezas en solventes de distinta polaridad. Además, el cambio de polaridad del solvente permite separar fracciones de diferente tamaño de los QD. La purificación de los QD de CdSe es un paso esencial después de su síntesis para mejorar su calidad óptica, estabilidad química y funcionalidad. Se purificaron las síntesis de CdSe con diferentes relaciones molares MPA/MES utilizando etanol absoluto mediante el método de precipitación por diferencia de polaridades. El procedimiento de purificación se muestra en la Figura 38.

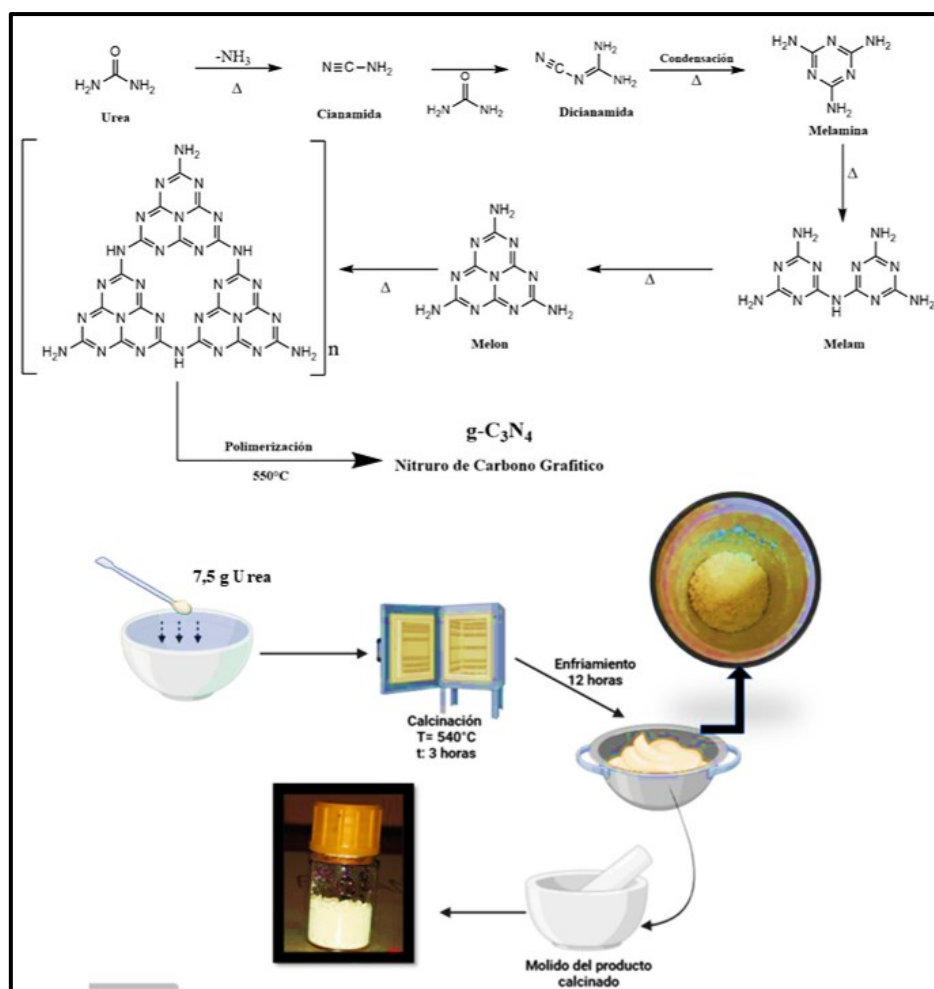


**Figura 38.** Diagrama del proceso de purificación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe mediante precipitación, utilizando etanol.

Se agregaron 2,0 mL de la síntesis de MPA/MES CdSe en un eppendorf, a los cuales se le añadieron 2,0 mL de etanol absoluto y se dejaron en reposo durante 30 minutos. Pasado este tiempo se llevó toda la mezcla a agitación en un vortex a 1000 rpm durante 5 minutos para garantizar la separación de todos los iones libres en solución. Luego, se introdujo el eppendorf en una centrifuga a 10000 rpm durante 15 minutos para separar los puntos cuánticos (producto precipitado) de los iones libres (producto sobrenadante). Este procedimiento se realizó por triplicado para garantizar la eliminación de impurezas y para obtener la fracción de QD mayoritaria, en donde en cada centrifugación se añadió una mezcla 1:1 etanol: agua, se dispersó el precipitado nuevamente y se sometió a centrifugación bajo las mismas condiciones. Luego de realizar este paso, el producto precipitado final se disolvió en solución acuosa alcalina, pH 10, para asegurar la estabilidad de los QD purificados y mantenerlos a las mismas condiciones de síntesis. Los puntos cuánticos purificados se guardaron a temperatura ambiente en recipientes esterilizados de vidrio.

## 16.6. Síntesis de nitruro de carbono grafítico

La preparación del nitruro de carbono grafítico ( $g-C_3N_4$ ) se realizó por pirólisis<sup>260</sup> de urea, la que actuó como precursor del nanomaterial, dando lugar a la formación de unidades estructurales de heterociclos de tri-S-triazina/heptazina ( $C_6N_7$ ). La síntesis de  $g-C_3N_4$  se realizó en crisoles de 30 mL de capacidad, utilizando además una mufla eléctrica con una potencia de 2,6 kW y a una temperatura máxima de 600°C. Para la calcinación de la urea fue necesario realizar una programación de temperatura en función del tiempo de manera de alcanzar 540 °C en forma controlada, para garantizar la pirolisis del precursor y la formación de las unidades de tri-S-triazina que darán lugar a la formación del  $g-C_3N_4$ . El flujo de calor utilizado en el proceso fue de 10°C/min. El proceso de síntesis y los mecanismos de reacción de la policondensación de la urea, se muestra en la Figura 39.



**Figura 39.** Mecanismo químico para la formación de  $g-C_3N_4$  a partir de urea (arriba) y proceso de formación de  $g-C_3N_4$  (abajo).

El proceso inicia a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). En un periodo de tiempo de 5 minutos la temperatura alcanza los 50 °C y es allí en donde se aplica un programa de calentamiento. A partir de este punto, empiezan a generarse las reacciones correspondientes de condensación de las moléculas de urea presentes en el crisol. En particular, los procesos de síntesis a partir de urea implican un paso de formación de melamina<sup>261</sup>. Esto sugiere que la generación de melamina debería ser un paso clave o intermedio para sintetizar g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

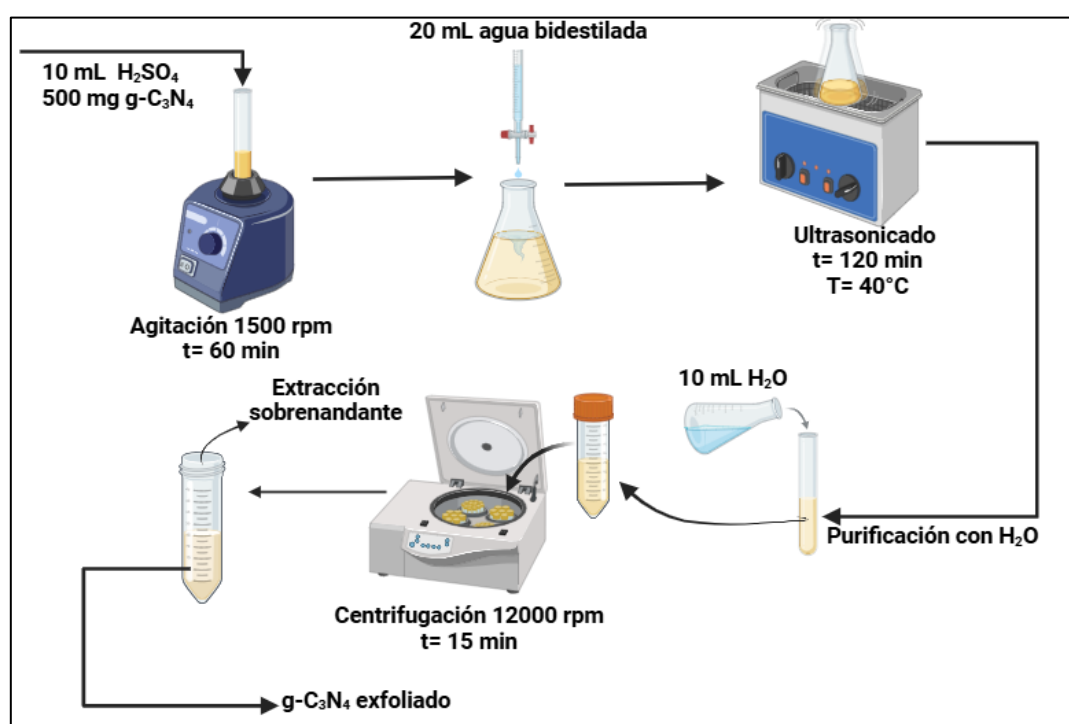
La condensación de urea procede a través de la etapa de formación de un dímero, que se condensa adicionalmente en melamina acompañado con la eliminación de amoníaco y vapor de agua. En el intervalo de temperaturas entre 539 °C y 540 °C los monómeros de melamina se unen hasta formar unidades de tri-S-triazina<sup>262</sup>, los cuales reaccionan entre sí para dar formación al producto final de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Posterior a la pirolisis, el crisol se dejó enfriar dentro de la mufla por 12 horas, aproximadamente, hasta que la temperatura descendió a 25 °C. Luego de realizada la calcinación, el producto resultante se recolectó, se molió en un mortero para homogeneizarlo y se almacenó. El producto de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> obtenido fue de 265,2 mg, lo que indica que el rendimiento de formación del nanomaterial fue de 3,5%.

#### **16.6.1. Exfoliación de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>**

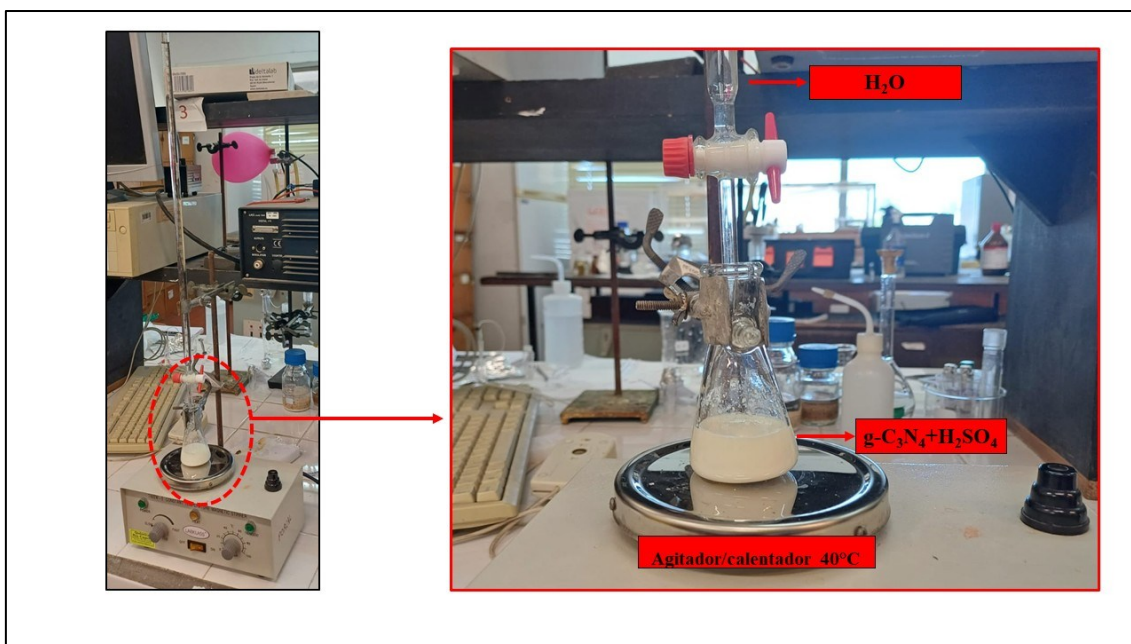
Hay muchos métodos de exfoliación de materiales de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a granel con el objetivo de obtener láminas individuales o un conjunto de unas pocas láminas. Estos métodos son la exfoliación térmica, la exfoliación por molienda mecánica, la exfoliación química y los métodos de choque térmico con gas. Para la separación de las nanolaminas sintetizadas a partir de la calcinación de la urea, se siguió la metodología de exfoliación química con un ácido fuerte, tal y como se describe en la literatura<sup>263</sup>. 500 mg de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a granel se mezclaron con 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se llevó a agitación en un vortex a 1500 rpm durante 60 minutos. Cuando se agrega el ácido sulfúrico concentrado y se somete a agitación, se produce la protonación de las nanolaminas y, por consiguiente, la separación de las nanolaminas formadas en la síntesis por repulsión electrostática, para dar lugar a agrupaciones de nanolaminas menos densas y separadas entre sí. Pasado el tiempo de agitación descrito, se añadieron 20 mL de agua bidestilada

y la suspensión cambió el color de amarillo a blanco. La mezcla fue llevada a sonicated a una temperatura de 40°C durante 2 horas. Al agregar agua a esta mezcla, el rápido efecto exotérmico provocó una delaminación parcial y una desintegración del grano de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> por la disociación de los puentes de hidrógeno débiles y apilamiento de láminas por interacciones de los orbitales moleculares  $\pi$ , acelerando la intercalación del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre capas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Además, el ácido puede actuar como agente oxidante débil de los grupos NH<sub>2</sub> terminales bajo el calentamiento producido por la adición excesiva de agua. El resultado fue la obtención de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en fragmentos de tamaño más pequeño ligeramente empaquetados.

La etapa de purificación del nanomaterial se desarrolló mediante lavados de la solución exfoliada con agua hasta alcanzar un valor de pH neutro de la dispersión de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Finalizado el procedimiento, la muestra se secó en una estufa a 60°C durante 12 horas para así obtener el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado en polvo. La Figura 40 describe el proceso de exfoliación realizado para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> sintetizado y la Figura 41 muestra el montaje experimental realizado para la exfoliación del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> previamente calcinado.



**Figura 40.** Proceso de exfoliación mediante tratamiento químico y purificación del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

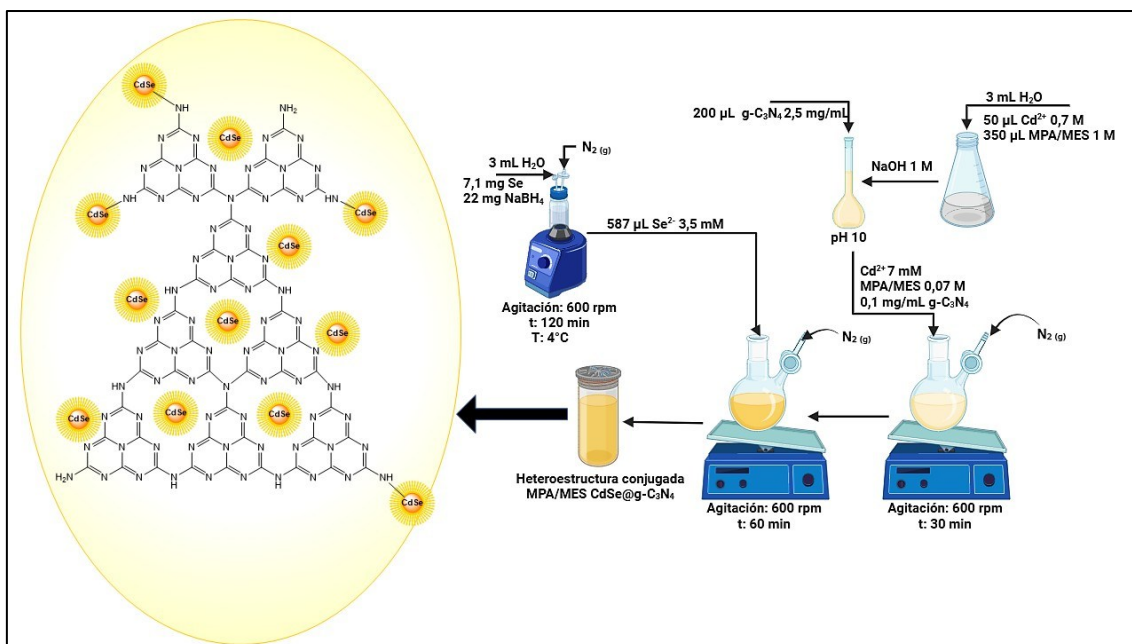


**Figura 41.** Montaje experimental para la exfoliación del  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ .

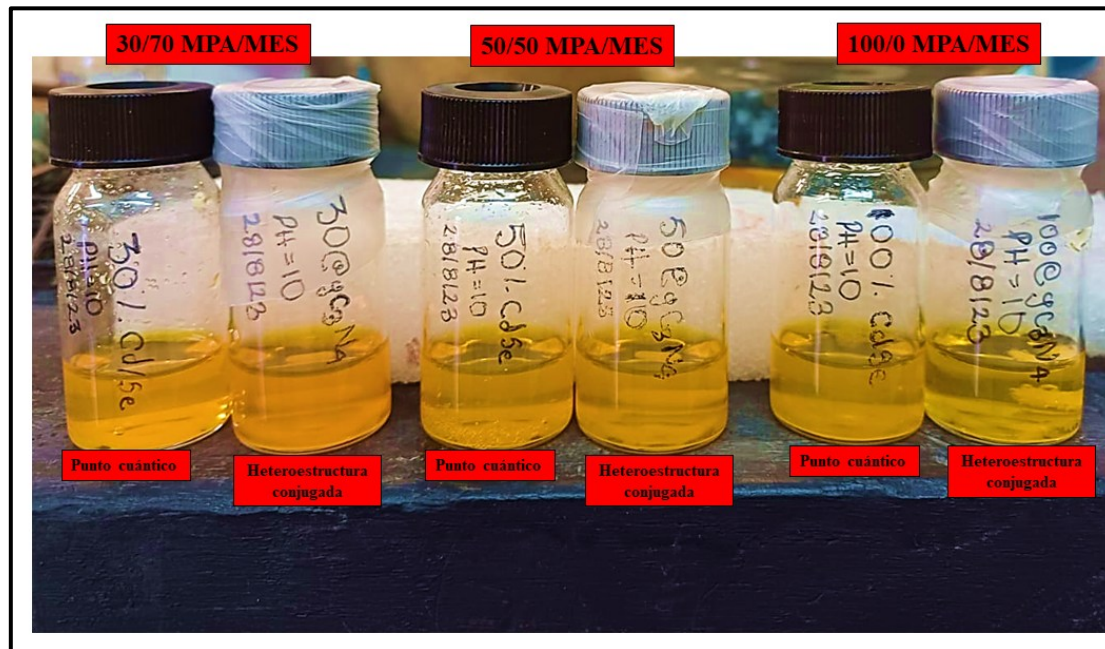
### 16.7. Síntesis de la heteroestructura conjugada MPA/MES $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4$

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de los procesos ópticos y electroquímicos, se sintetizaron heteroestructuras conjugadas a partir de los puntos cuánticos MPA/MES  $\text{CdSe}$  y el  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  exfoliado de cuya finalidad consistió en el mejoramiento en la intensidad de EQL. Para ello, se sintetizaron heteroestructuras conjugadas de MPA/MES  $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4$  con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50 y 100/0.

El proceso de síntesis para la conjugación de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  exfoliado y los QD MPA/MES  $\text{CdSe}$  se llevó a cabo mediante el crecimiento in situ de MPA/MES  $\text{CdSe}$  sobre el  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , como se muestra en la Figura 42. Adicionalmente, la Figura 43 muestra la comparación de los QDs MPA/MES  $\text{CdSe}$  y las heteroestructuras conjugadas sintetizadas.



**Figura 42.** Síntesis y estructura química de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.



**Figura 43.** Comparación visual de las síntesis de QD MPA/MES CdSe y las heteroestructuras conjugadas CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a relaciones molares de MPA/MES 30/70 (izquierda), 50/50 (centro) y 100/0 (derecha).

Se prepararon soluciones con un volumen final de 5 mL de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> partiendo de una solución acuosa de Cd<sup>2+</sup> y solución del estabilizador MPA/MES, ajustada a pH 10 con una solución de NaOH 1 M. Luego, se agregaron 200 µL de una dispersión 2,5 mg/mL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, y la solución tomó una coloración blanco pálido sin turbidez.

A continuación, la solución se burbujeó con N<sub>2</sub> durante 30 min bajo agitación a 600 rpm. Después, se inyectó rápidamente una solución acuosa de Se<sup>2-</sup> manteniendo la agitación, en donde la solución blanca pálida se volvió amarilla/naranja. Todas las soluciones se termostataron a 25 °C.

### **16.8. Bioconjugación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe con esterigmatocistina**

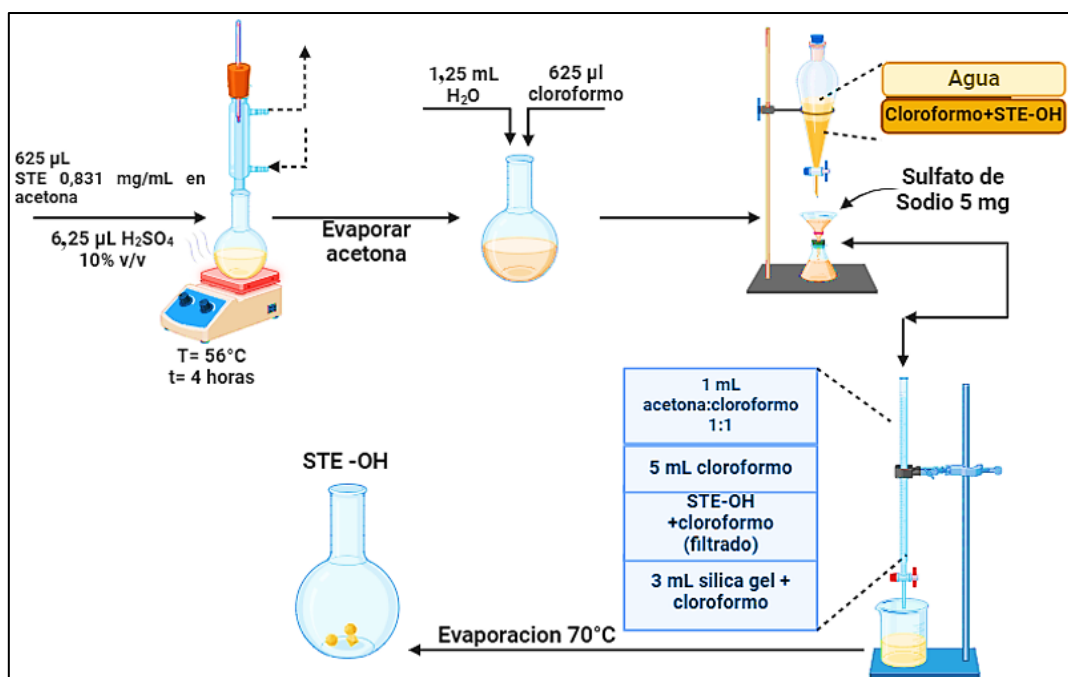
La bioconjugación de QDs CdSe con STE tiene como objetivo desarrollar un bioconjugado competidor para el desarrollo de un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de STE en muestras de maíz.

Para la bioconjugación de QD MPA/MES CdSe (relación 30/70) con la STE (bioconjugado CdSe@STE), se necesitaron pasos previos de modificación estructural de STE, como de activación superficial de los puntos cuánticos.

#### **16.8.1. Síntesis de esterigmatocistina hemiacetal**

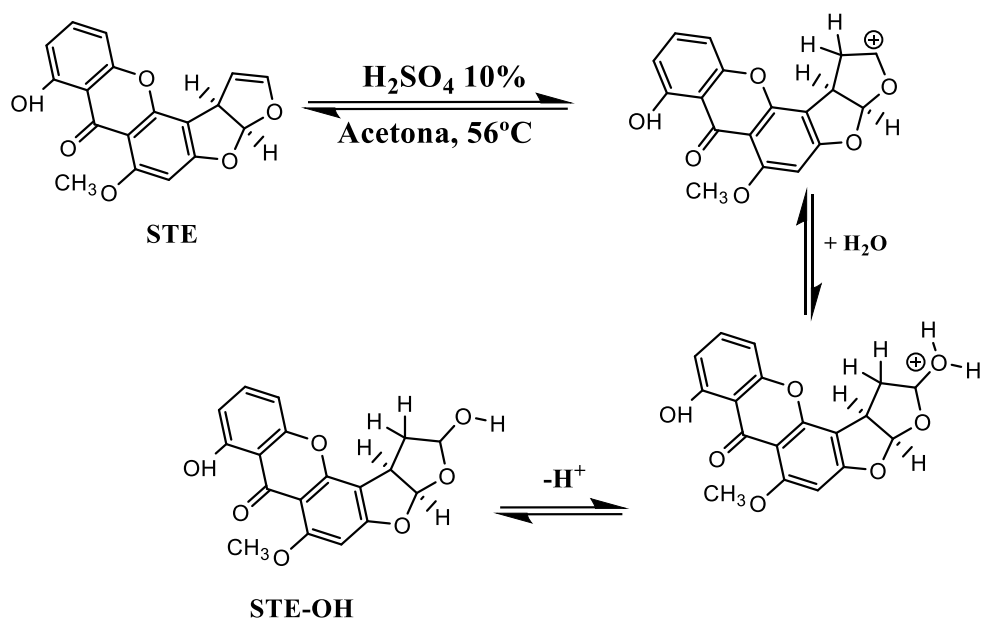
Para llevar a cabo el proceso de bioconjugación de los QD MPA/MES CdSe con la STE, previamente se realizó una síntesis de modificación estructural de la STE para obtener su forma hemiacetal (abreviado STE-OH).

La Figura 44 muestra la metodología utilizada para la obtención de STE-OH, siguiendo la metodología descrita en la literatura<sup>264,265</sup>.



**Figura 44.** Esquema de la síntesis de formación de STE-OH a partir de STE.

Como muestra la Figura 44, la síntesis de la STE-OH se obtuvo cuando a 625 µL de una solución 0,831 mg/mL de STE, disuelta en acetona, se le añadieron 6,25 µL de ácido sulfúrico al 10% hirviendo la mezcla durante 4 h a 56 °C bajo condición de reflujo. A continuación, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se añadieron 1,25 mL de agua. Posteriormente, se adicionó un volumen de 625 µL de cloroformo, generando dos fases. La STE-OH se transfirió a la fase orgánica. Esta etapa de partición se repitió 5 veces, recogiendo la y juntando la fase orgánica. Luego, la fase orgánica fue tratada con 5 mg de sulfato de sodio, y se filtró. La solución libre de agua se filtró y se pasó por una columna con silica gel (0,040-0,063 mm) disuelta en cloroformo. Previamente, la columna se lavó con 5 mL de cloroformo y, luego, con 1 mL de una mezcla de cloroformo + acetona (1:1). La solución recogida se evaporó a 70°C hasta sequedad. De esta manera, se obtuvo la STE-OH en estado sólido. El producto obtenido se pesó y se disolvió en 500 µL de etanol, obteniendo una concentración de STE-OH de 0,069 mg/mL, asumiendo una eficiencia de 80 %, como se encuentra reportado en la literatura<sup>264,265</sup>. La formación del grupo hemiacetal en la estructura química de la STE se muestra en la Figura 45.

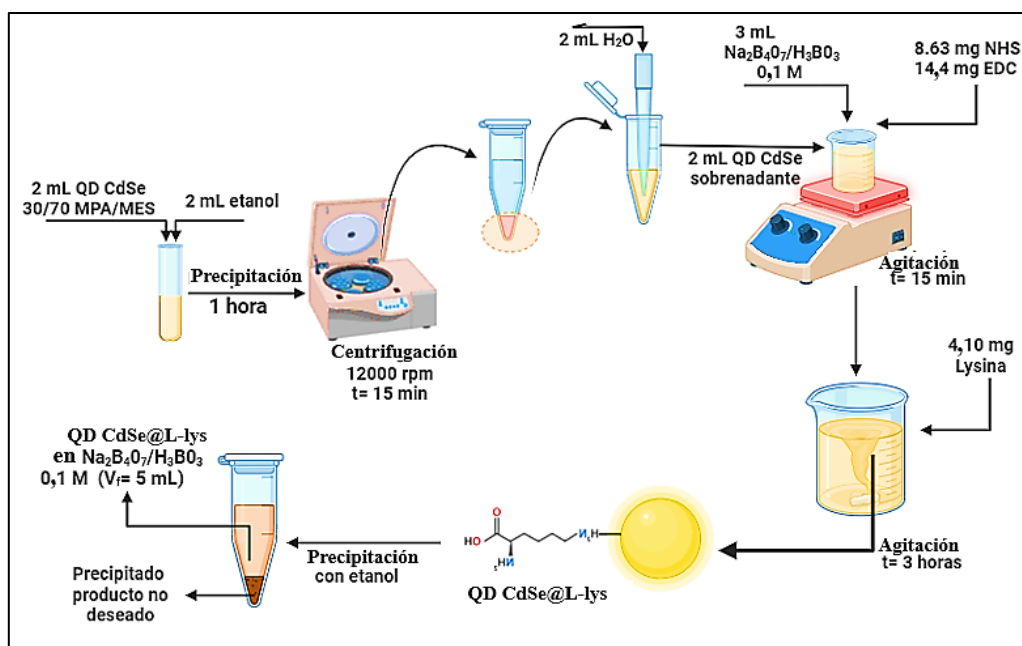


**Figura 45.** Mecanismo de formación de STE-OH a partir de STE en medio ácido.

### 16.8.2. Conjugación de STE-OH con puntos cuánticos MPA/MES CdSe

Los QD MPA/MES CdSe cuentan en su superficie con un tiol (ácido 3-mercaptopropiónico) el cual presenta un grupo carboxilo en su extremo terminal libre. Para lograr la bioconjugación de los QD con la forma hemiacetal de la esterigmatocistina, fue necesario modificar el grupo carboxilo terminal del tiol con dos objetivos; primero agregar una cadena carbonada espaciadora entre el QD y ST-OH con el objetivo de minimizar su efecto en la posterior interacción con el anticuerpo y segundo, disponer de grupos amina para unir covalentemente el QD a STE-OH.

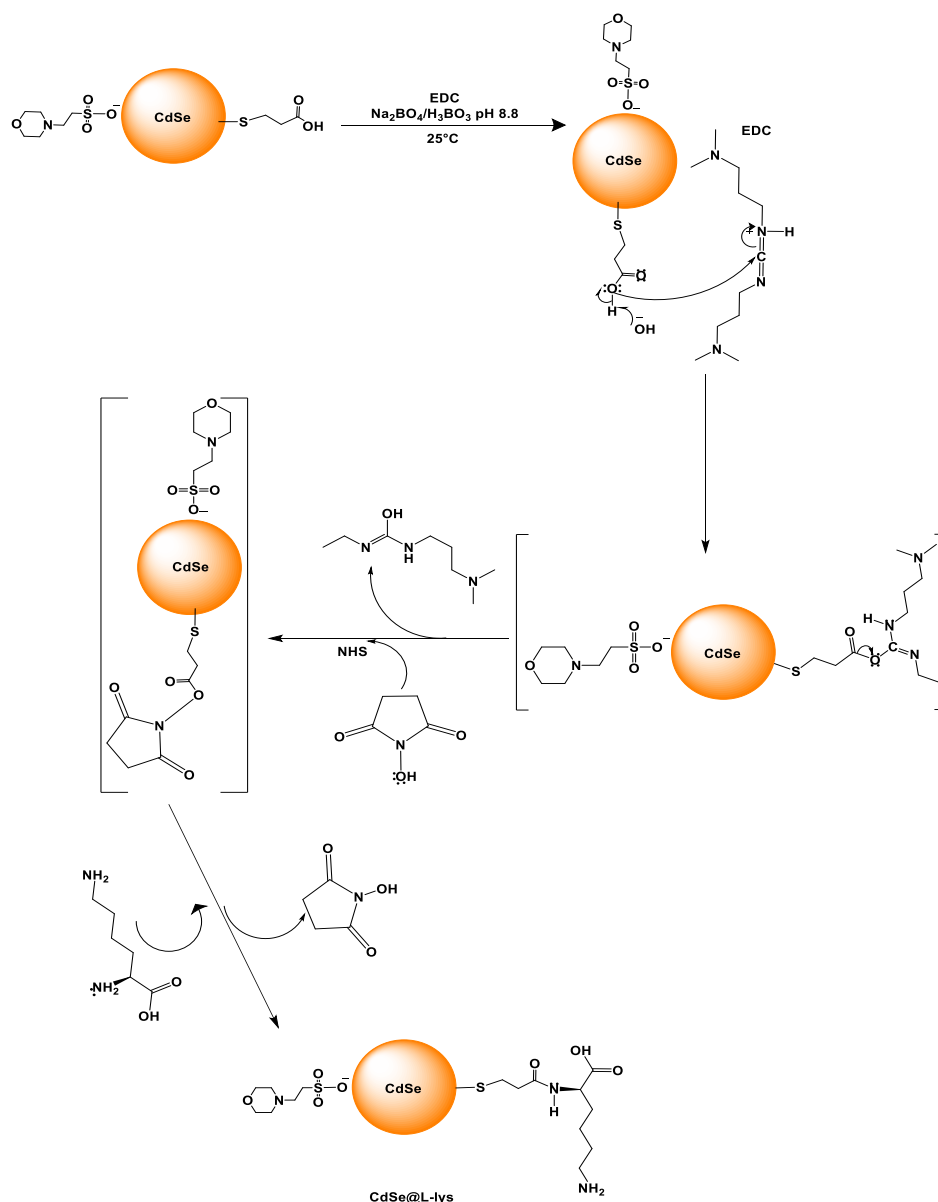
Primero, se realizó la síntesis de unión de QDs MPA/MES CdSe con L-lisina (L-lys, molécula enlazante/espaciadora)<sup>266</sup>. La formación de un enlace covalente entre la amina primaria de la L-lys y el grupo carboxílico del MPA se esquematiza en la Figura 46.



**Figura 46.** Esquema del proceso de conjugación de CdSe@L-lys.

Inicialmente los QD MPA/MES CdSe se purificaron por precipitación selectiva por cambio de polaridad de solvente, encontrándose los de menor tamaño en el sobrenadante, y los de mayor tamaño en el precipitado. El proceso de precipitación se repitió dos veces. Para el proceso de unión con L-lys por cuestiones de rendimiento de fluorescencia se utilizaron los QD de menor tamaño. En el siguiente paso, se realizó la unión de los puntos cuánticos CdSe con L-lys, utilizando como activador del grupo carboxilo del capping del QD la carbodiimida (EDC) y como estabilizador del éster formado, N-hidroxisuccinimida (NHS)<sup>267,268</sup>. Para ello, se agregaron 14,4 mg de EDC y 8,63 mg NHS en solución tampón de boratos, pH 8,8 dando lugar a la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del MPA de los QD y el grupo amina de la L-lys.

Luego, se realizaron procesos de purificación para obtener el producto deseado mediante el agregado de etanol con posterior centrifugación, recolectando el sobrenadante. De esta manera se obtuvo como producto CdSe@L-lys, dejando expuesto un grupo amina para su unión con STE-OH. La Figura 47 detalla el mecanismo de reacción para la formación de CdSe@L-lys.

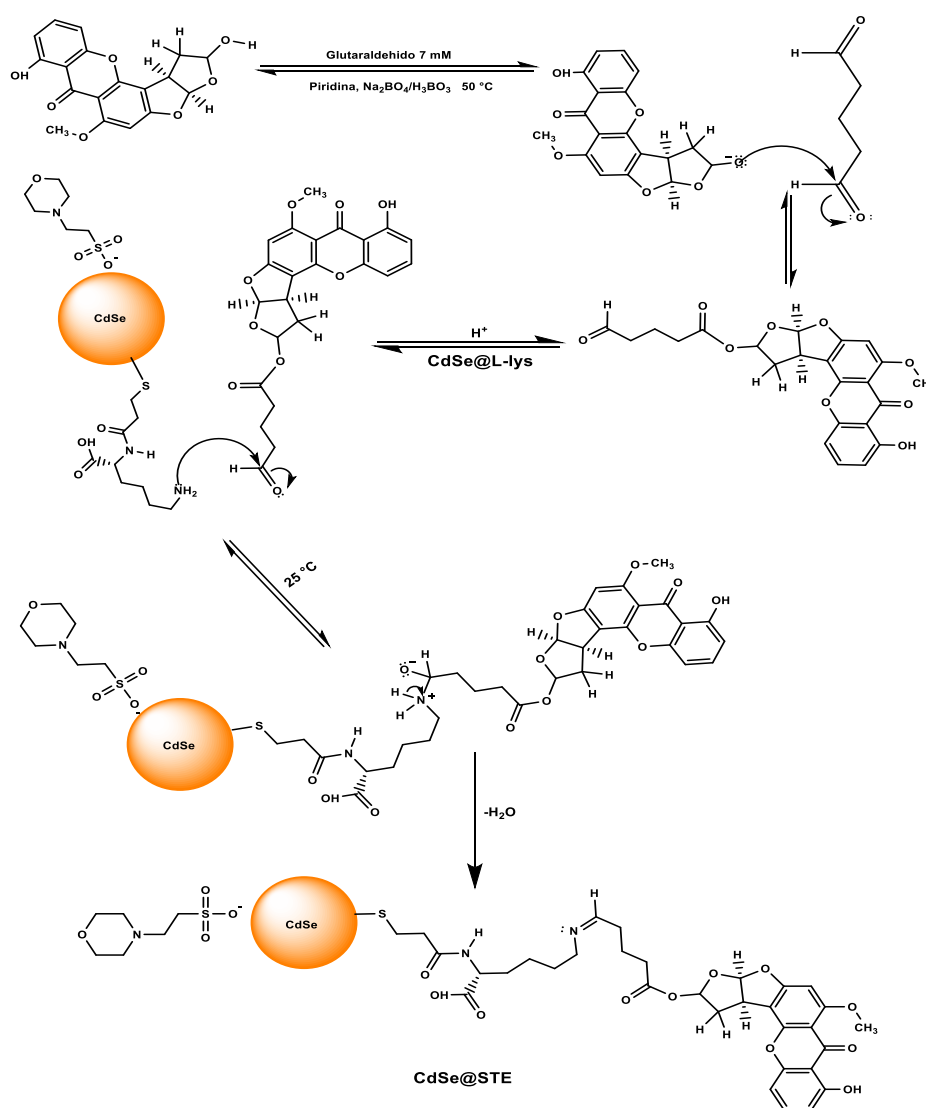


**Figura 47.** Mecanismo de reacción para la obtención de CdSe@L-lys.

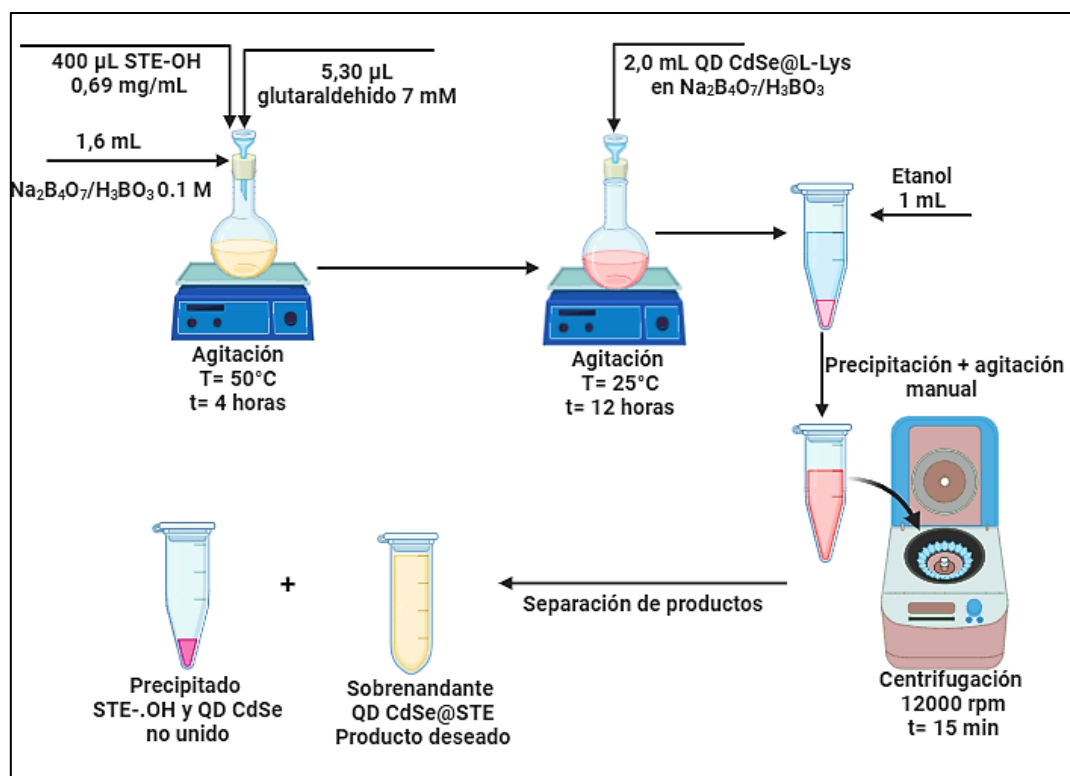
A partir de la obtención de CdSe@L-lys, se realizó el proceso de síntesis para la bioconjugación con la STE-OH. El mecanismo de reacción de esta bioconjugación se muestra en la Figura 48 y la metodología experimental y pasos para la formación del bioconjugado CdSe@STE se muestra en la Figura 49.

La bioconjugación de la STE-OH con CdSe@L-lys consistió en una serie de pasos para llegar al producto final. Primeramente, se realizó un proceso de unión de STE-OH con glutaraldehído (reactivo bifuncional), el cual permite dejar un grupo aldehído expuesto capaz de reaccionar con el grupo amino disponible de L-lys conjugada a los QD de CdSe.

La reacción se realiza en un tampón de borato a pH ligeramente alcalino, en presencia de piridina (actúa como fuente de electrones para estabilizar el reactivo intermediario), mediante la adición de 7,3  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído 7 mM a 400  $\mu\text{L}$  de STE-OH en solución tampón borato, pH 8,8. Luego, se agregan 2 mL de CdSe@L-lys, en donde se une al grupo amina expuesto de L-lys con el grupo carbonilo terminal de STE-OH modificada con glutaraldehído, resultando en la formación de un enlace imina<sup>269</sup>. El último paso, da como resultado el bioconjugado CdSe@STE requerido para los inmunoensayos competitivos en el inmunosensor<sup>270</sup>.



**Figura 48.** Mecanismo de reacción para la formación del bioconjugado CdSe@STE.



**Figura 49.** Esquema de la síntesis de bioconjugación de CdSe@STE.

### 16.9. Preparación de solución tampón de Tris – HCl

El Tris-HCl se utiliza en EQL cuando se utiliza como coreactante una amina. Su capacidad tampón minimiza variaciones en el pH durante la medición, lo cual es crucial para sistemas sensibles a cambios de protonación. Además, puede actuar como un donador de protones, favoreciendo la generación de especies excitadas en ciertos sistemas. Su alta solubilidad y compatibilidad con biomoléculas lo hacen ideal para aplicaciones en biosensores y ensayos inmunoquímicos.

A partir de las propiedades de la solución tampón Tris – HCl, las medidas de EQL se realizaron utilizando como electrolito soporte esta solución, la cual se preparó a partir de Tris(hidroximetil) – aminometano (también llamado Trizma base). Para lograr una concentración de 0,1 M, se disolvieron 6,25 g de Trizma base en 500 mL de agua bidestilada; posteriormente, el pH se ajustó a 7,4 utilizando una solución 0,1 M de HCl. La solución se almacenó a temperatura de 4°C para su posterior uso.

#### **16.10. Preparación de la solución tampón de fosfato**

La solución tampón de fosfato, la cual se utilizó como electrolito de soporte para los estudios de EQL en la región catódica, y para el ensamble del inmunosensor como simulador del medio biológico para los anticuerpos monoclonales utilizados y la esterigmatocistina a detectar. Para los ensayos de EQL catódica, se preparó la solución tampón agregando a 100 mL de agua bidestilada 0,068 g de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) y 0,089 g de di-Sodio hidrogeno fosfato dihidrato ( $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ ). La solución se llevó a pH 7,5 agregando NaOH 1 M. Para el ensamble del inmunosensor, así como también el uso de los anticuerpos, la STE y la extracción de la matriz biológica de detección, se utilizó una solución tampón de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en ingles). Para preparar 1000 mL de PBS, se utilizaron 0,89 g de di-Sodio hidrogeno fosfato dihidrato ( $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ ), 0,68 g de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ), 8 g de NaCl y 0,2 g de KCl. El pH de la solución se ajustó a 7,5 utilizando NaOH 1 M.

#### **16.11. Preparación de la solución tampón de borato**

La solución tampón de borato se utiliza en diversas aplicaciones debido a su capacidad de mantener un pH estable en el rango de 8,0 a 10,0, ideal para reacciones que requieren condiciones ligeramente alcalinas. En bioconjugación, se emplea para favorecer la estabilidad de biomoléculas, mejorar la solubilidad de reactivos y facilitar la activación de grupos carboxilo en reacciones de acoplamiento con EDC/NHS. Además, su baja reactividad con otras especies químicas lo hace útil en sistemas de detección y en la estabilización de nanopartículas y puntos cuánticos.

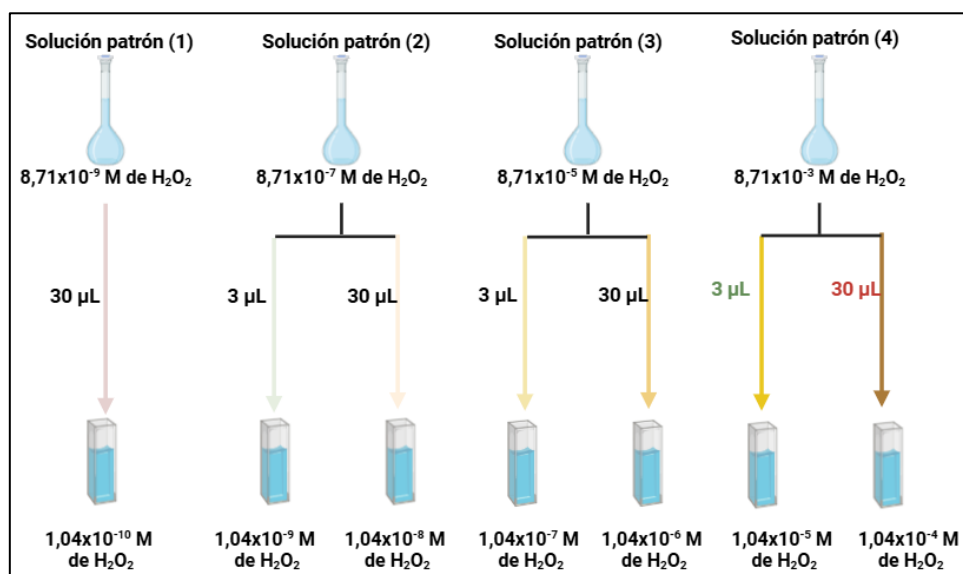
Para llevar a cabo la bioconjugación de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe con la STE-OH, se preparó una solución tampón de borato 0,1 M; para ello, se disolvieron 0,53 g de borato de sodio ( $Na_3BO_3$ ) en agua bidestilada para obtener la concentración deseada. Posteriormente, el pH se ajustó a 8,8 mediante la adición de 0,45 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) lo que permite mantener un equilibrio adecuado entre las especies de borato en solución tampón.

## 16.12. Preparación de las soluciones de peróxido de hidrógeno

Para la detección de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en muestras de suero usando la sonda electroquimioluminiscente formada por heteroestructuras conjugadas de MPA/MES  $\text{CdSe}@g\text{-C}_3\text{N}_4$ , se prepararon soluciones a partir de una solución stock como se describe a continuación:

- Solución patrón (1): de un reactivo concentrado de 8,71 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se extrajo 1  $\mu\text{L}$  y se diluyó en 1000  $\mu\text{L}$  de tris-HCl, para una concentración final  $8,71 \times 10^{-3}$  M.
- Solución patrón (2); a partir de la solución patrón (1), adicionando 5  $\mu\text{L}$  en 500  $\mu\text{L}$  de tris-HCl, se preparó una solución de concentración  $8,71 \times 10^{-5}$  M.
- La solución patrón (3), de concentración  $8,71 \times 10^{-7}$  M se preparó a partir de la solución patrón (2), agregando 5  $\mu\text{L}$  en 500  $\mu\text{L}$  de tris-HCl.
- La solución patrón (4) con concentración  $8,71 \times 10^{-9}$  M se preparó a partir de la solución patrón (3), agregando 5  $\mu\text{L}$  en 500  $\mu\text{L}$  de tris-HCl.

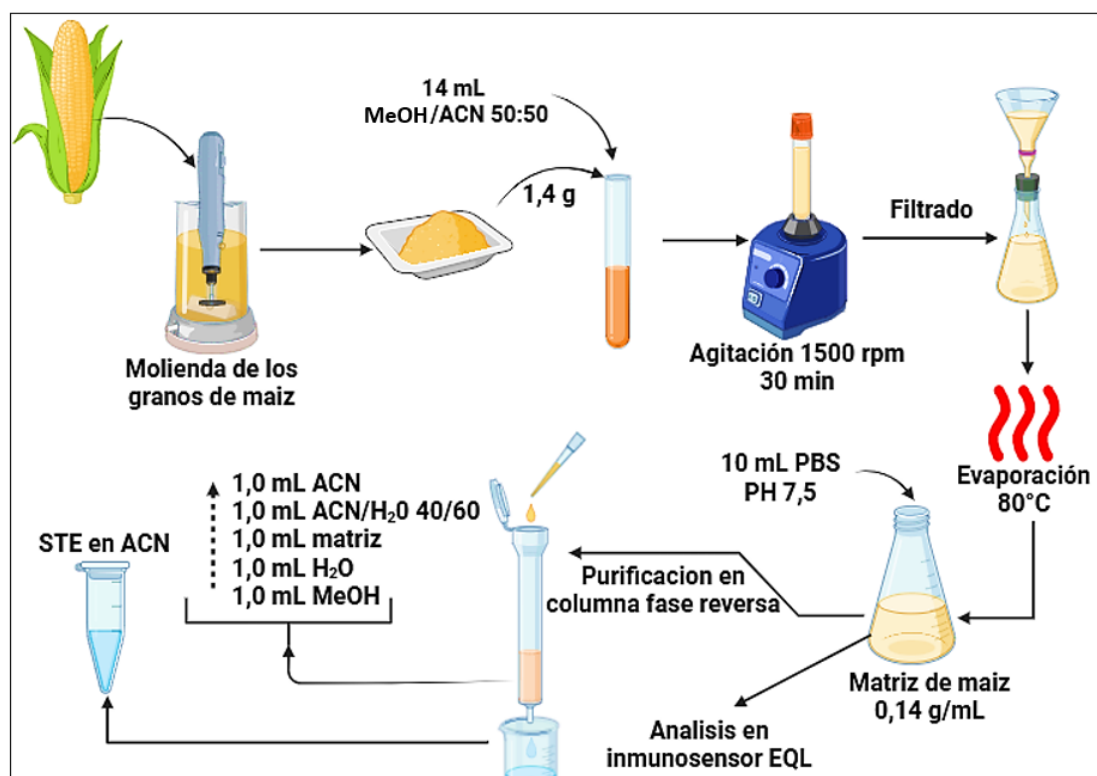
A un volumen final de 2500  $\mu\text{L}$  de solución tampón Tris – HCl, se le añadieron distintos volúmenes de las soluciones previamente preparadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con el fin de obtener concentraciones finales de peróxido de hidrógeno en el rango de  $1,04 \times 10^{-10}$  M a  $1,04 \times 10^{-4}$  M. La preparación de las soluciones finales para los estudios de detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante EQL se muestra en la Figura 50.



**Figura 50.** Preparación de las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para su determinación por electroquimioluminiscencia.

### 16.13. Extracción de la matriz de maíz

La detección de la STE se realizó utilizando como muestra extracto de maíz el cual se contaminó con la micotoxina. Este extracto se utilizó tanto para la detección de STE en el inmunosensor, así como también para los ensayos de validación mediante HPLC. La Figura 51 muestra el proceso de extracción y purificación del extracto de maíz.



**Figura 51.** Procedimiento experimental para la obtención y purificación del extracto de maíz utilizado para la detección de STE por el inmunosensor y por HPLC.

Se molieron aproximadamente 30 g de granos de maíz en un molinillo hasta llevarlo a una consistencia polvorienta. El polvillo obtenido se secó en una estufa durante 24 horas a 40°C y posteriormente, se pesaron 1,4 g de maíz seco y se agregaron en tubos eppendorf, a los cuales se les agregaron 14 mL de una solución 50/50 metanol/acetonitrilo (MeOH/ACN). Luego, los tubos se colocaron bajo agitación a 1500 rpm durante 30 minutos. Pasado el tiempo de agitación, la solución se filtró, en donde la solución recogida se evaporó a 80°C hasta sequedad. Al extracto de maíz libre de MeOH/ACN se le agregaron 10 mL de tampón PBS.

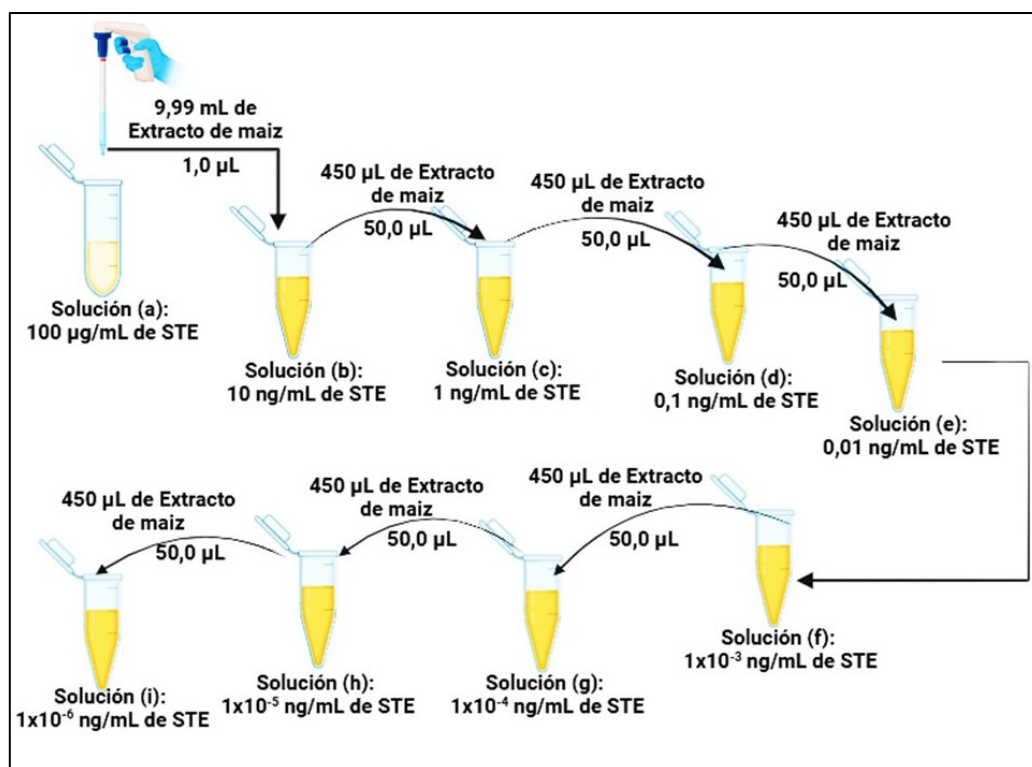
La concentración de la solución preparada fue de 0,14 g de maíz/mL. De la solución de 0,14 g/mL, 1 mL de la matriz de maíz se purificó en una columna de fase reversa, la que previamente se adecuó con 1,0 mL de MeOH. Luego se hicieron pasar 1,0 mL de agua bidestilada y posteriormente se hizo pasar la matriz de maíz hasta que toda la solución se eluyó. 1,0 mL de una mezcla ACN/H<sub>2</sub>O 40/60 se hizo pasar por la columna para eliminar impurezas solubles en medio acuoso y separar las moléculas polares.

El producto retenido en la columna fue eluído agregando 1,0 mL del ACN. El eluído se utilizó para las medidas de HPLC. Este procedimiento de purificación se utilizó para muestras contaminadas con STE y sin contaminar con la micotoxina, la que fue utilizada como control negativo.

#### **16.13.1. Preparación de las soluciones de extracto de maíz contaminadas con STE**

Para la detección de la STE en la muestra de maíz, se prepararon soluciones de STE utilizando la matriz de maíz 0,14 g/mL, la cual se contaminó exprofeso con una solución patrón de STE en ACN comercial. El procedimiento de preparación de las muestras fue el siguiente:

1. Solución stock de STE: se preparó una solución de STE 0,8335 mg/mL en ACN.
2. A partir de la solución stock, se prepararon 1000 µL de concentración 100 µg/mL de STE, agregando 120 µL de la solución stock en 880 µL de del extracto de maíz (solución (a)).
3. De la solución (a) se prepararon diluciones en serie, tal y como se observa en la Figura 52.



**Figura 52.** Preparación de las muestras de maíz contaminadas expofreso con STE para los estudios de detección con el inmunosensor electroquimioluminiscente.

### 16.13.2. Preparación de las soluciones para las mediciones HPLC

Para los estudios de comparación de la performance del inmunosensor electroquimioluminiscente por HPLC, se realizó una curva de calibración siguiendo el método de adición estándar<sup>271</sup> a partir de dos muestras de STE de concentraciones  $1,4 \times 10^{-4}$  ng/mL y  $1,4 \times 10^{-2}$  ng/mL respectivamente. Como fase móvil se utilizó una mezcla formada por solución acuosa 0,1 M de H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> y ACN, en una relación 7/5. Inicialmente se pesaron 3,97 g de H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> y se agregaron a 292 mL de agua bidestilada. Luego se adicionaron 208 mL de ACN esto debido a que la relación de volumen de la solución de fosfato monopotásico con respecto al volumen final de la solución es de 7/12. El volumen de ACN utilizado para preparar la fase móvil requerida fue de 208 mL correspondiente a la relación 5/12 respecto al volumen final de la solución.

#### **16.14. Limpieza y activación de los electrodos ITOs**

Para las mediciones y estudios de EQL anódica se utilizaron electrodos ITOs los cuales fueron previamente limpiados y activados para estandarizar la superficie conductora de los electrodos y evitar efectos de desactivación de los procesos de emisión de luz y de las reacciones redox. Así, en un tubo eppendorf se agregaron 5 mL de etanol absoluto y se sumergió el ITOs.

A continuación, el eppendorf se llevó a ultrasonido durante 30 minutos a 35°C. Luego el electrodo fue extraído del etanol absoluto y llevado a otro eppendorf con agua bidestilada y se sonicó por 30 minutos a 25°C. Posteriormente, el electrodo fue extraído del eppendorf con agua y secado en atmosfera de argón durante 5 minutos.

El electrodo seco se colocó en una caja de Petri y se llevó a una estufa a 40 °C durante 60 min. Finalmente se extrajo y se guarda en una caja de Petri cubierta a temperatura ambiente. Este procedimiento se repite para la reutilización de los electrodos ITOs.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## **17. Caracterización de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe**

Se realizó la caracterización de las propiedades ópticas y morfológicas de los QD MPA/MES CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50, 100/0 y 150/0, respectivamente.

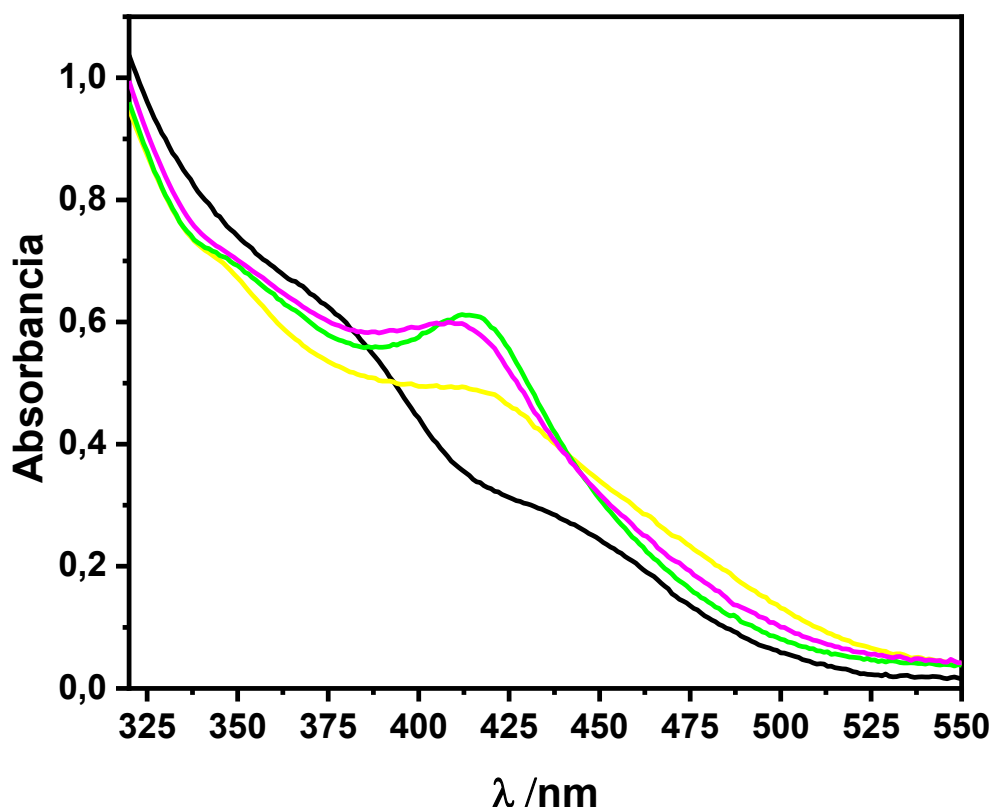
### **17.1. Caracterización óptica de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe**

Inicialmente, se midieron los espectros de absorción de los QD MPA/MES CdSe para evaluar sus propiedades ópticas y confirmar su estructura electrónica. A través de la posición del máximo de absorción, relacionado con la transición excitónica fundamental, fue posible determinar el ancho de banda energética entre la BC y BV de los QD, el tamaño y su distribución. Además, mediante los espectros de absorción, se buscó analizar la permanencia del capping de recubrimiento y descartar efectos de agregación o cambios en la dispersión coloidal que podrían afectar las propiedades ópticas y electrónicas de los QD CdSe.

La Figura 53 muestra los espectros de absorción obtenidos los QD CdSe sintetizados con las diferentes relaciones molares MPA/MES diluidos 100 veces en 2,5 mL de solución. Se pueden distinguir dos bandas de absorción para cada una de las síntesis, lo que indica la variabilidad en los tamaños de los QD en cada una de las síntesis, así como también diferencias de energía de los estados electrónicos asociados a defectos superficiales o estados trampas de los puntos cuánticos<sup>272</sup>.

De los espectros de absorción se observó que, en las muestras donde MES está presente en la estabilización (MPA/MES 30/70 y 50/50), aparece una banda de absorción más definida en la región entre 340 y 375 nm. Esto sugiere que la distribución de tamaños de los QD es más heterogénea; el MES podría inducir una mayor polidispersión en los tamaños de los QDs, reflejado en la aparición de más de una banda con absorciones a diferentes longitudes de onda, con distintos niveles de confinamiento cuántico. En contraste, en los QD sintetizados en ausencia de MES en el capping (MPA/MES 100/0 y 150/0), la banda en esta región no es tan definida, lo que indica una distribución de tamaños más uniforme y una síntesis más controlada en términos de crecimiento de los QDs.

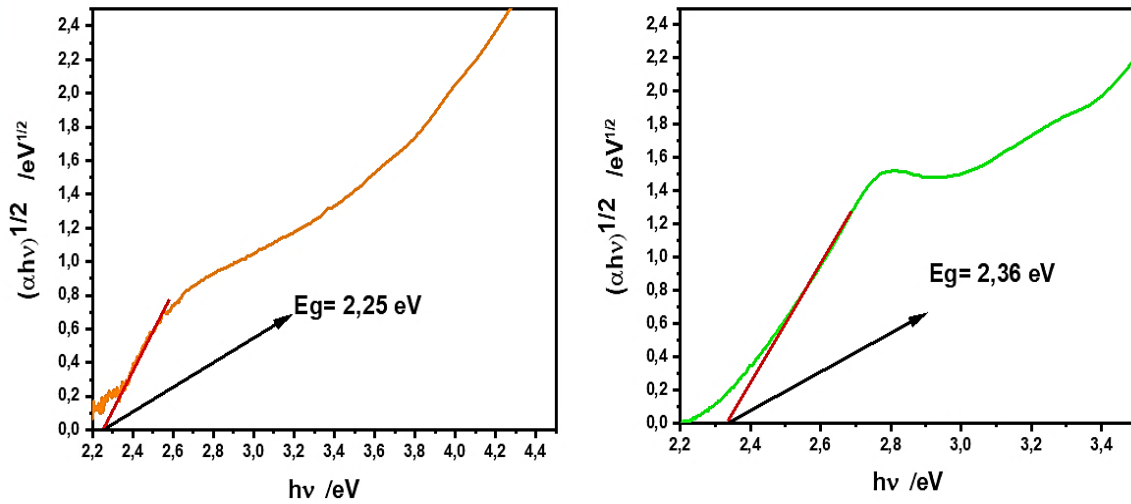
Este comportamiento confirma que MES influye en la nucleación y el crecimiento de los QD, posiblemente al modificar la dinámica de pasivación de la superficie. La mayor heterogeneidad en tamaño cuando MES está presente se debe a una pasivación superficial en donde el equilibrio entre MPA y MES favorece la coexistencia de varias poblaciones de QD con tamaños distintos debido a la fuerza de la interacción entre el estabilizante y la superficie del QD y la concentración de cada uno de los estabilizantes.



**Figura 53.** Espectros de absorción medidos en solución acuosa para los QD CdSe sintetizados a relaciones molares de estabilizadores MPA/MES de: 30/70 (—); 50/50 (—); 100/0 (—); 150/0 (—).

El MPA estabiliza los QD de CdSe mediante la formación de un enlace S–Cd, limitando fuertemente el crecimiento de los nanocristales. Por otro lado, el MES forma un complejo entre el grupo sulfonato y  $\text{Cd}^{2+}$  en la superficie de los QD CdSe, siendo esta una interacción más débil. La banda de absorción que se ubica en el rango entre 400 y 460 nm corresponde a la primera banda excitónica, que depende de la composición de los estabilizadores<sup>273</sup>. Con el aumento de MES en la relación molar de MPA/MES, se observa un desplazamiento hacia una energía más baja (corrimiento batocrómico) y un cambio en la forma de la primera banda excitónica.

A partir de los espectros de absorción es posible determinar el valor del  $E_g$ , el cual está directamente relacionado con el tamaño de los QD sintetizados, así como también por el confinamiento cuántico de los mismos. Dentro de las alternativas para el cálculo de  $E_g$ , el método óptico expuesto por Tauc<sup>253</sup>, permite determinar una aproximación del valor de  $E_g$  en semiconductores. Los intervalos de  $E_g$  de las muestras se determinaron mediante el ajuste de las transiciones ópticas en los bordes de absorción, utilizando el modelo Tauc/David–Mott<sup>274</sup>. La Figura 54 muestra los gráficos de Tauc para las síntesis de QD CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70 y 100/0 respectivamente.



**Figura 54.** Gráficos de Tauc para los QD CdSe sintetizados con relaciones molares MPA/MES de: 30/70 (—) y 100/0 (—). Determinación de los valores aproximados de  $E_g$  de acuerdo con el criterio de extrapolación.

Se determinaron homológamente los valores de  $E_g$  para los QD CdSe con relaciones molares MPA/MES 50/50 y 150/0. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. El  $E_g$  aumenta cuando la concentración molar del MPA en el capping es mayor. El  $E_g$  está directamente relacionado con el tamaño de los QD CdSe, siendo este último el que determina su brecha energética. Así, el  $E_g$  aumenta cuando disminuye el tamaño de los QD.

La determinación del diámetro de los QD de CdSe fue llevada a cabo mediante métodos reportados en la literatura<sup>275</sup>. Existen ecuaciones que relacionan la energía del electrón en sus estados basal y excitado, permitiendo calcular el  $E_g$  (ecuación 2) y, en consecuencia, el diámetro del QD semiconductor mediante las siguientes ecuaciones:

$$E_g = E_g^{bulk} + \frac{h^2}{8m_0R^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) - \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{CdSe}R} \quad (32)$$

$$\Delta E_g = E_g - E_g^{bulk} \quad (33)$$

$$D = \sqrt{\frac{h^2}{8\Delta E_g} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right)} \quad (34)$$

R corresponde al radio del nanocrystal, h es la constante de Planck,  $m_e$  es la masa efectiva del electrón,  $m_h$  es la masa efectiva del hueco, e es la carga del electrón y,  $\epsilon_{CdSe}$  la permitividad dieléctrica del QD. El valor de  $E_g^{bulk}$  corresponde la  $E_g$  del material en su forma masiva (bulk), es decir, cuando el material no está en forma de nanopartícula o QD; para el CdSe este valor es de 1,74 eV. Para QDs semiconductores con tamaños inferiores a 3 nm, las anteriores ecuaciones no proporcionan un valor preciso del diámetro, ya que no consideran los defectos superficiales ni los estados trampa que pueden afectar la determinación de  $E_g$ .

Por esta razón, se han desarrollado metodologías experimentales reportadas en la literatura que permiten calcular con mayor precisión los diámetros y los coeficientes de extinción de los QD a partir de la longitud de onda del primer pico de absorción, asociado con la transición electrónica desde el estado fundamental hasta el primer estado excitado<sup>276</sup>. Así, para QD de CdSe se ha reportado que se pueden obtener el diámetro y el coeficiente de extinción a través de las ecuaciones:

$$D = (1,6122 \times 10^{-9}) \times \lambda^4 - (2,6575 \times 10^{-6}) \times \lambda^3 + (1,6242 \times 10^{-3}) \times \lambda^2 - (0,4277) \times \lambda + 41,57 \quad (35)$$

$$\epsilon = 5857 \times D^{2,65} \quad (36)$$

$$\epsilon = 1600 \times E_{\lambda, 1er \text{ pico abs}} \times D^3 \quad (37)$$

La ecuación (35) es un ajuste polinomial en función de los diámetros obtenidos por TEM y DRX. Esta ecuación permite determinar el diámetro de los QD CdSe por medio de la longitud de onda máxima del primer pico de absorción presente en el espectro UV-visible. A partir del diámetro obtenido, la ecuación (36) determina el coeficiente de extinción molar, mientras que la ecuación (37) permite hacer un ajuste de los coeficientes de

extinción obtenidos teniendo en cuenta el diámetro y el primer pico de absorción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

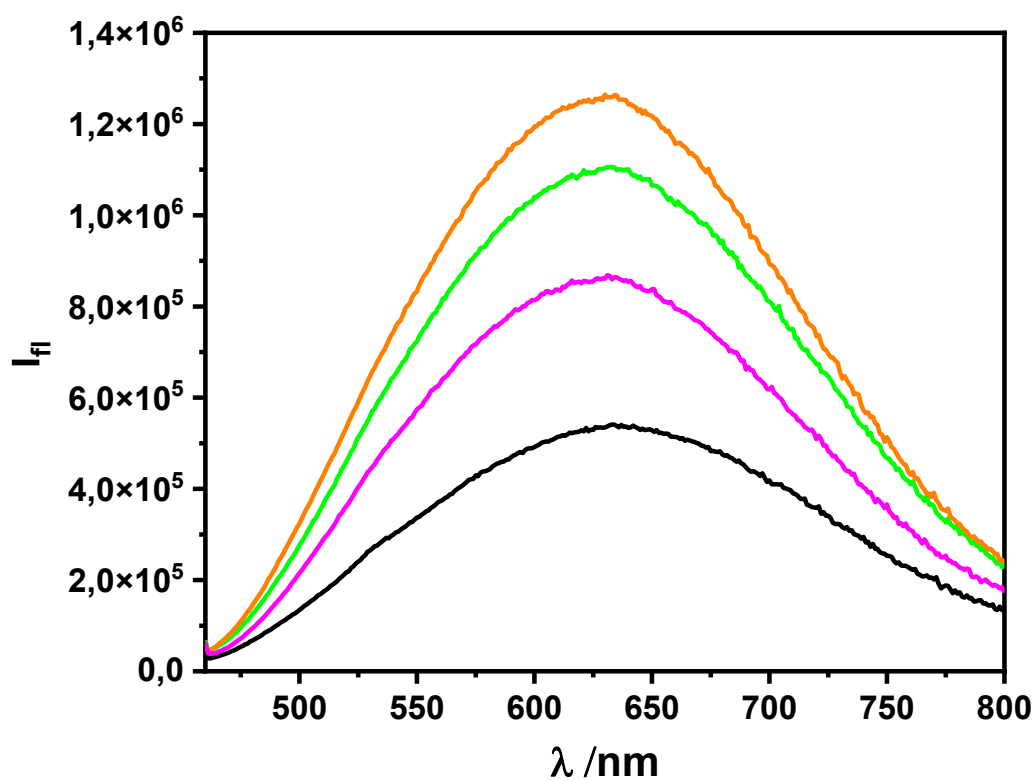
**Tabla 5.** Valores experimentales del diámetro, coeficiente de extinción y banda prohibida energética, determinados a partir de los gráficos de absorción, para QD CdSe en función de la relación molar MPA/MES.

| <b>Relación molar<br/>MPA/MES</b> | <b><math>\lambda_{\text{abs}}^{\text{1er pico}}</math> /nm</b> | <b>D /nm</b> | <b><math>\epsilon</math> /M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup></b> | <b><math>E_g</math> /eV</b> |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>30/70</b>                      | 454                                                            | 1,9          | $3,62 \times 10^4$                                           | 2,25                        |
| <b>50/50</b>                      | 422                                                            | 1,7          | $2,54 \times 10^4$                                           | 2,30                        |
| <b>100/0</b>                      | 415                                                            | 1,5          | $2,10 \times 10^4$                                           | 2,36                        |
| <b>150/0</b>                      | 409                                                            | 1,6          | $2,20 \times 10^4$                                           | 2,33                        |

Seguidamente, a partir de los espectros de emisión, se analizaron la intensidad de fluorescencia para las cuatro síntesis realizadas. Teniendo en cuenta la caracterización por espectroscopia UV-visible, se tomó como longitud de onda de excitación el valor de 450 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia se muestran en la Figura 55.

De acuerdo con los resultados, cuando las soluciones se excitaron a 450 nm, los espectros de emisión de fluorescencia presentaron una banda simétrica centrada cerca de 630 nm. La amplia banda de emisión se corresponde a la distribución de tamaño de los QDs de CdSe<sup>277</sup>. Además, es necesario considerar los estados trampa de los puntos cuánticos. La presencia de estados trampa en la superficie de los QD altera significativamente su comportamiento óptico, en particular su espectro de fotoluminiscencia. Estos estados trampa actúan como niveles energéticos adicionales dentro de la banda prohibida, afectando la recombinación entre electrones y huecos. Como resultado, en lugar de observarse una emisión bien definida correspondiente a la recombinación entre la banda de conducción y la banda de valencia, aparece una cola de emisión a mayores longitudes de onda (menores energías). Esto ocurre porque algunos electrones caen en estos estados antes de recombinarse, liberando energía en forma de fotones de menor energía que la

transición directa del material<sup>278</sup>. Este fenómeno es característico de QDs con defectos superficiales, en donde la eficiencia cuántica se ve disminuida.



**Figura 55.** Espectros de emisión de intensidad de fluorescencia corregidas por absorbancia para los QD CdSe MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—) respectivamente.  $\lambda_{exc} = 450$  nm.

Con el aumento de la concentración de MES, se observó un ligero desplazamiento batocrómico del pico de la banda de emisión (Tabla 6). A partir de los espectros de fotoluminiscencia, se determinó el ancho total a la mitad del máximo (FWHM), el cual se refiere a la distancia (en términos de longitud de onda o energía) entre los dos puntos donde la intensidad del pico espectral cae hasta la mitad de su valor máximo. Un FWHM más estrecho indica un tamaño más uniforme de los QD, así como también superficies con una baja densidad de estados trampa, mientras que un FWHM más ancho sugiere una mayor distribución de energías de emisión, así como una distribución de tamaños de los nanocristales.

De los resultados de la Tabla 6 se puede decir que, el FWHM aumentó alrededor de 6 nm cuando la proporción de MES en el recubrimiento aumentó, debido a una disminución en

la tasa de nucleación y un aumento en la tasa de crecimiento del cristal, ya que MES es un ligando más débil que MPA además de que cuando aumenta la concentración de MES disminuye la concentración de MPA<sup>279</sup>.

A partir de los espectros de emisión y absorción se pudo conocer la energía mínima de transición del estado singlete ( $E_{0-0}$ ). Los resultados se muestran en la Tabla 6. En este sistema, el valor de  $E_{0-0}$  resulta ligeramente mayor que  $E_g$  debido a la presencia de estados trampa y dispersión en el tamaño de los puntos cuánticos. En sistemas con poblaciones de nanopartículas monodispersos y sin estados trampa, la  $E_{0-0}$  se aproxima estrechamente al  $E_g$ , ya que la transición óptica ocurre directamente entre los niveles confinados del estado fundamental y el estado excitado, sin participación de estados defectivos ni relajaciones adicionales<sup>280</sup>.

Además, se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia a partir de las intensidades de emisión para cada síntesis de QD CdSe. Los rendimientos cuánticos se calcularon usando fluoresceína en etanol como estándar, quien presenta un rendimiento cuántico conocido de 0,63, por medio de la siguiente ecuación:

$$\phi_{fl} = \frac{A_{muestra} \times Abs_{ref}}{A_{ref} \times Abs_{muestra}} \times \left( \frac{\eta_{muestra}}{\eta_{ref}} \right)^2 \times \phi_{ref} \times \frac{(1 - 10^{-Abs_{ref}})}{(1 - 10^{-Abs_{muestra}})} \quad (38)$$

donde  $A_{muestra}$  y  $A_{ref}$  son las áreas obtenidas a partir de la integración de los espectros de emisión de fluorescencia para los QD y la fluoresceína respectivamente,  $\eta_{muestra}$  y  $\eta_{ref}$  son los índices de refracción de la muestra y referencia respectivamente, obtenidos de la bibliografía. El último término de la ecuación es el factor de corrección que se usó cuando las absorbancias de la muestra ( $Abs_{muestra}$ ) y referencia ( $Abs_{ref}$ ) no fueron iguales a la longitud de onda de excitación. Las absorbancias se ajustaron por debajo de 0,1. Los valores obtenidos (Tabla 6) concordaron con los encontrados en la literatura, considerando que el rendimiento cuántico de los QD de CdSe disminuye en solución acuosa debido a la alta polaridad del agua<sup>281</sup>. Además, el rendimiento cuántico para los QD de CdSe sintetizados utilizando solo MPA como estabilizador fue aproximadamente un 45 % mayor en comparación con los QD de CdSe obtenidos utilizando proporciones de estabilizadores de MPA/MES de 50/50 y 30/70, debido a una mejor pasivación de la superficie y al control de los defectos de la superficie.

Los resultados de rendimientos cuánticos determinados confirman que el complejo MES disminuye las propiedades ópticas de los nanocristales sintetizados.

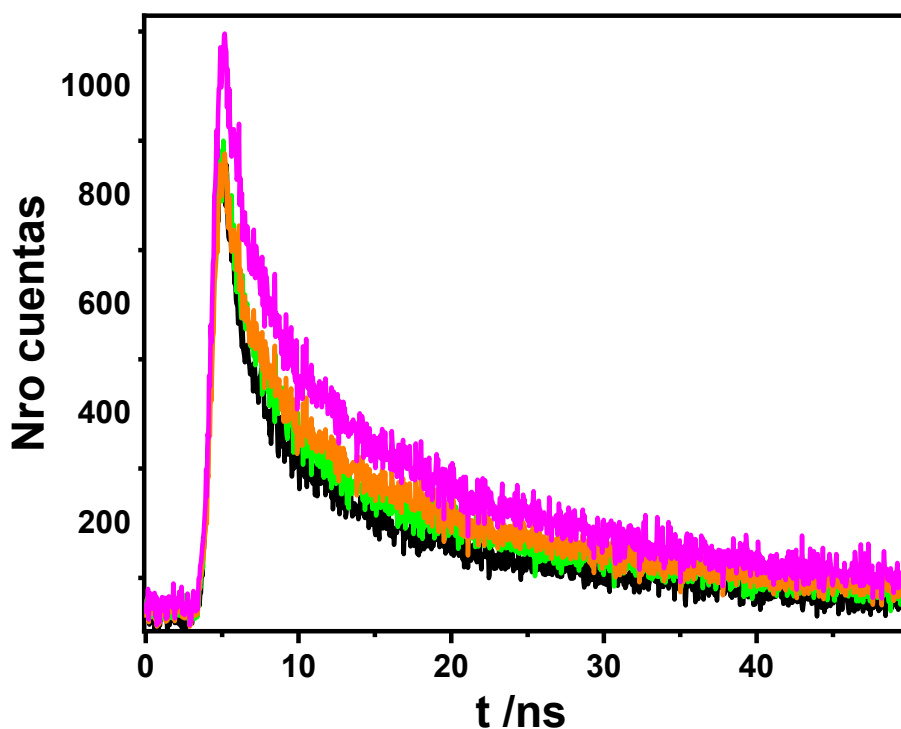
**Tabla 6.** Longitud de onda máxima de emisión, energía mínima del estado singlete, FWHM y rendimiento cuántico de fluorescencia obtenidos a partir de los espectros de emisión de intensidad de fluorescencia para los QD CdSe sintetizados.

| Relación molar<br>MPA/MES | $\lambda_{em}^{max}$ /nm | $E_{0-0}$ /eV | FWHM /nm | $\phi_{fl}$ /% |
|---------------------------|--------------------------|---------------|----------|----------------|
| 30/70                     | 635                      | 2,49          | 210      | 3,22           |
| 50/50                     | 632                      | 2,52          | 206      | 4,04           |
| 100/0                     | 622                      | 2,56          | 204      | 5,19           |
| 150/0                     | 621                      | 2,55          | 202      | 4,87           |

El decaimiento de la emisión de fluorescencia en función del tiempo se determinó utilizando la espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo excitando los diferentes QDs a 370 nm (Tabla 7)<sup>282</sup>. Todos los decaimientos mostraron un mejor ajuste a partir de la siguiente función biexponencial, común para los ajustes de los decaimientos de fluorescencia de QD formados a partir de elementos de los grupos II-VI<sup>283</sup>:

$$I(t) = \beta_1 \exp(-t/\tau_1) + \beta_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (39)$$

donde  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son factores preexponenciales, y  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son los tiempos de vida, que se obtuvieron del mejor ajuste de cada curva.  $\tau_1$  (decaimiento más rápido) se asigna a una recombinación directa del par  $h^+ - e^-$ , mientras que  $\tau_2$  (decaimiento más lento) se asigna a la recombinación electrón/hueco desde los estados trampa. Además, se observa una mayor contribución de  $\tau_2$  ( $\beta_2$  mayor que  $\beta_1$ ). Estos resultados son consistentes con las amplias bandas de emisión obtenidas para todas las relaciones MPA/MES como consecuencia de la presencia de ligandos tiolatos, que aumentan los defectos en la superficie de los QDs<sup>283</sup>. Los resultados se muestran en la Figura 56.



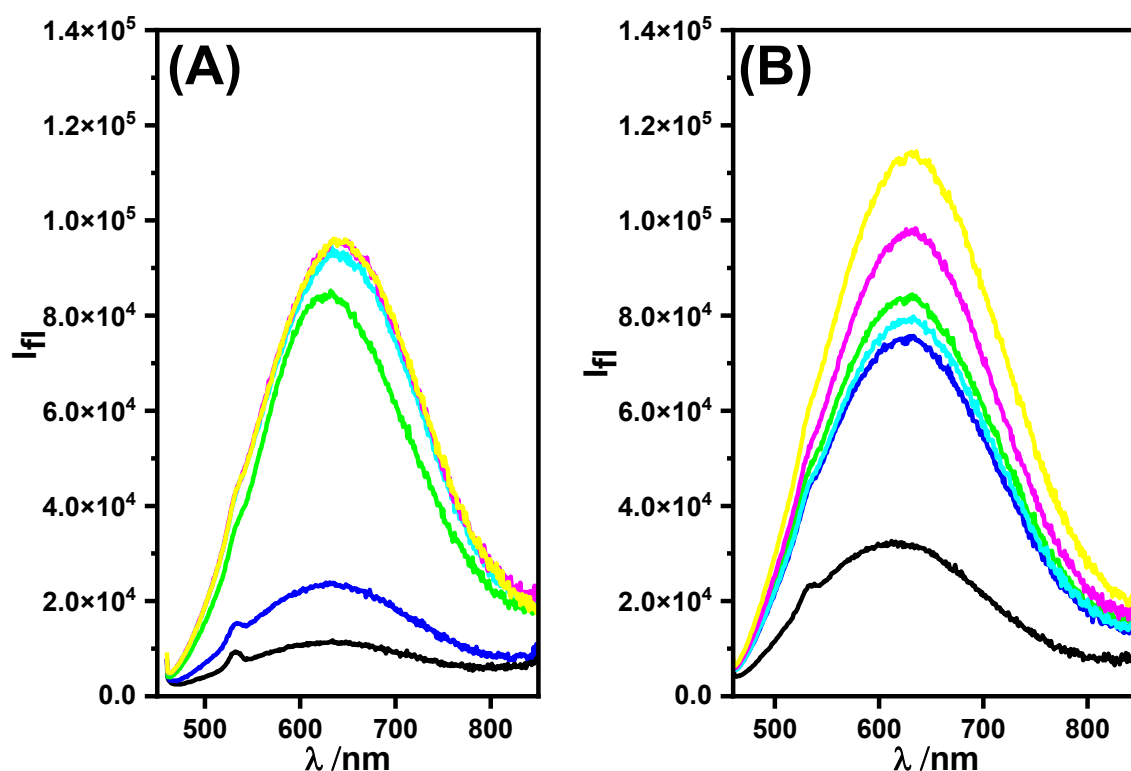
**Figura 56.** Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de los QD CdSe a relaciones molares MPA/MES de: 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—).

**Tabla 7.** Tiempos de vida de fluorescencia de los QD de CdSe sintetizados con distintas relaciones molares de MPA/MES.

| Relación molar MPA/MES | Tiempo de vida /ns |             |          |             |
|------------------------|--------------------|-------------|----------|-------------|
|                        | $\tau_1$           | $\beta_1$ % | $\tau_2$ | $\beta_2$ % |
| 30/70                  | 1,38               | 19          | 12,40    | 81          |
| 50/50                  | 1,98               | 21          | 15,43    | 79          |
| 100/0                  | 1,81               | 15          | 14,82    | 85          |
| 150/0                  | 1,84               | 10          | 16,50    | 90          |

Los espectros de fluorescencia registrados durante 24 h desde el inicio de la síntesis se muestran en la Figura 57 (A) para los QD de CdSe formados utilizando como estabilizador una relación molar de MPA/MES de 50/50. Durante los primeros 150 min, la emisión de fluorescencia aumentó alrededor del 80 % y, para tiempos mayores, la

intensidad se mantuvo prácticamente constante con un corrimiento batocrómico cercano a 10 nm, lo que indica un rápido equilibrio en la formación del QD.



**Figura 57.** Espectros de emisión de intensidad de fluorescencia registrados a 45 (—), 90 (—), 150 (—), 210 (—), 1320 (—) y 1440 (—) min de síntesis para los QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES de 50/50 (A) y 100/0 (B).  $\lambda_{exc} = 450$  nm.

Se observó el mismo comportamiento utilizando como estabilizador una relación molar de MPA/MES de 30/70. Sin embargo, para los QD de CdSe obtenidos utilizando una relación molar de MPA/MES de 100/0, la emisión de intensidad de fluorescencia aumentó lentamente hasta alcanzar su máximo a los 1440 min, donde la intensidad de emisión permanece constante (Figura 57 (B)). El aumento de MPA en la relación MPA/MES aumentó el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la formación de QDs produciendo una mejor pasivación de la superficie y el control de los defectos mejorando el rendimiento cuántico de fluorescencia.

Estos resultados sugieren que el MPA se une más fuertemente que el MES a la superficie de los nanocristales. Además, todos los QD de CdSe sintetizados mostraron un hombro a 540 nm en tiempos de reacción cortos, que se atribuye a la emisión directa del excitón, es

decir, la recombinación directa del par  $h^+ - e^-$  desde la BC a la BV, la llamada emisión de excitón de borde de banda del núcleo<sup>284</sup>. A medida que avanza el tiempo, hay un reordenamiento superficial con los estabilizadores MPA y MES, lo que lleva a la aparición de estados trampa, los que dan origen a un corrimiento batocrómico de la banda de emisión ( Figura 57 (A) y (B))<sup>283,285</sup>. Los resultados descritos anteriormente indican que la composición del estabilizador dual en la síntesis afecta el crecimiento, el tamaño y la forma de los QD, y a sus propiedades ópticas.

## 17.2. Caracterización morfológica y estructural de los puntos cuánticos CdSe

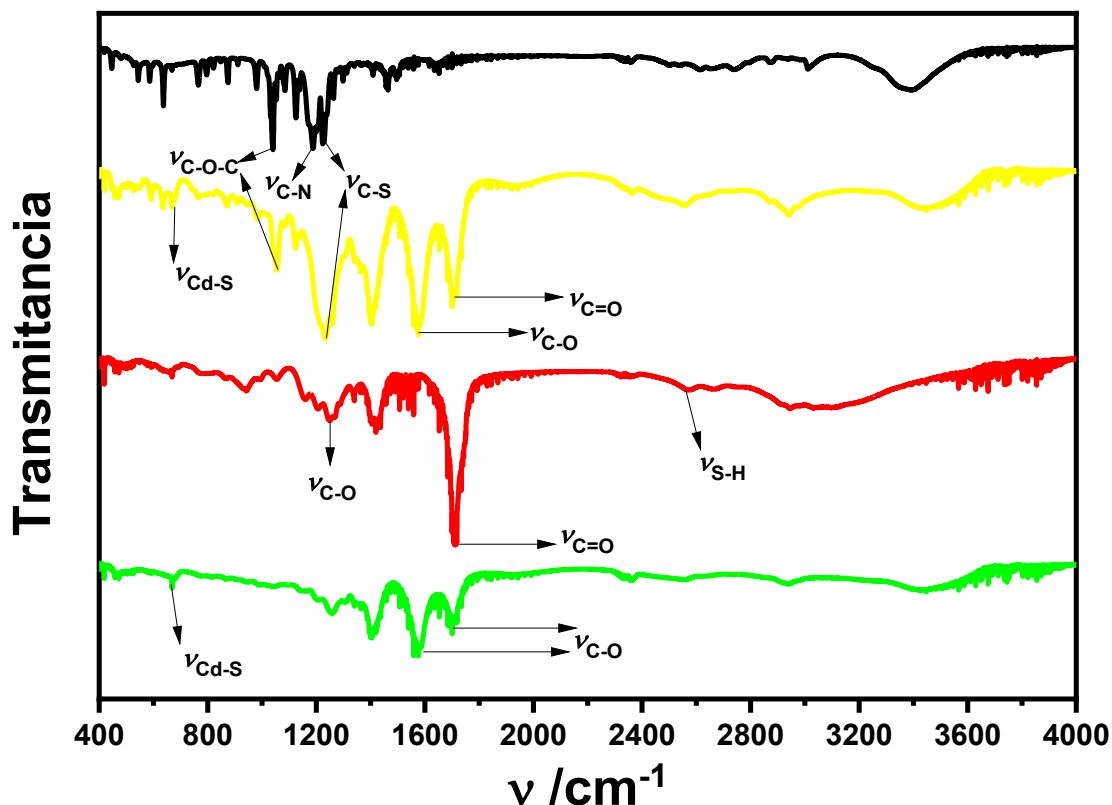
La formación de los puntos cuánticos de CdSe y la presencia de los estabilizantes MPA y MES en la superficie de los puntos cuánticos de CdSe se confirmó mediante FT-IR. La Figura 58 muestra el espectro FT-IR de los puntos cuánticos de CdSe con relación molar MPA/MES de 50/50 y 100/0, así como también los estabilizantes puros.

Solo para MPA se observaron bandas de vibración a  $1716\text{ cm}^{-1}$ ,  $1248\text{ cm}^{-1}$  y a  $2566\text{ cm}^{-1} - 2660\text{ cm}^{-1}$  que se deben a los grupos C=O, C-O y S-H, respectivamente<sup>286</sup>. Para los puntos cuánticos de CdSe con solo MPA como estabilizante (MPA/MES 100/0), se observó un pico a  $669\text{ cm}^{-1}$  debido a la vibración Cd-S y no se observó el pico de la vibración S-H ( $2562\text{ cm}^{-1} - 2645\text{ cm}^{-1}$ ), de acuerdo con la formación del enlace S-Cd. También, se observó una división de bandas correspondiente a COOH a  $1580\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$ , asignada a la absorción simétrica y asimétrica al anión carboxilato de MPA.

Por otro lado, el espectro FT-IR de MES muestra bandas características a  $1040\text{ cm}^{-1}$  debido a C-O-C,  $1187\text{ cm}^{-1}$  debido a la amina terciaria,  $766\text{ cm}^{-1}$  y  $1229\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de S-O y SO<sub>2</sub>OH, respectivamente. El espectro FT-IR de los puntos cuánticos de CdSe con relación molar MPA/MES de 50/50, muestra las bandas de MPA mencionadas anteriormente. Además, muestra que las bandas a  $767\text{ cm}^{-1}$  y  $1229\text{ cm}^{-1}$ ,  $1040\text{ cm}^{-1}$  y  $1170\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a S-O y SO<sub>2</sub>OH, C O-C y la amina terciaria, respectivamente, mostraron desplazamientos y deformaciones. La banda doble a  $1130\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a una vibración asimétrica del enlace SO<sub>3</sub>, está presente en el espectro de MES y desaparece en el espectro de los puntos cuánticos CdSe con relación MPA/MES

50/50, poniendo en evidencia la interacción del grupo sulfonato con la superficie de los puntos cuánticos sintetizados<sup>287,288</sup>.

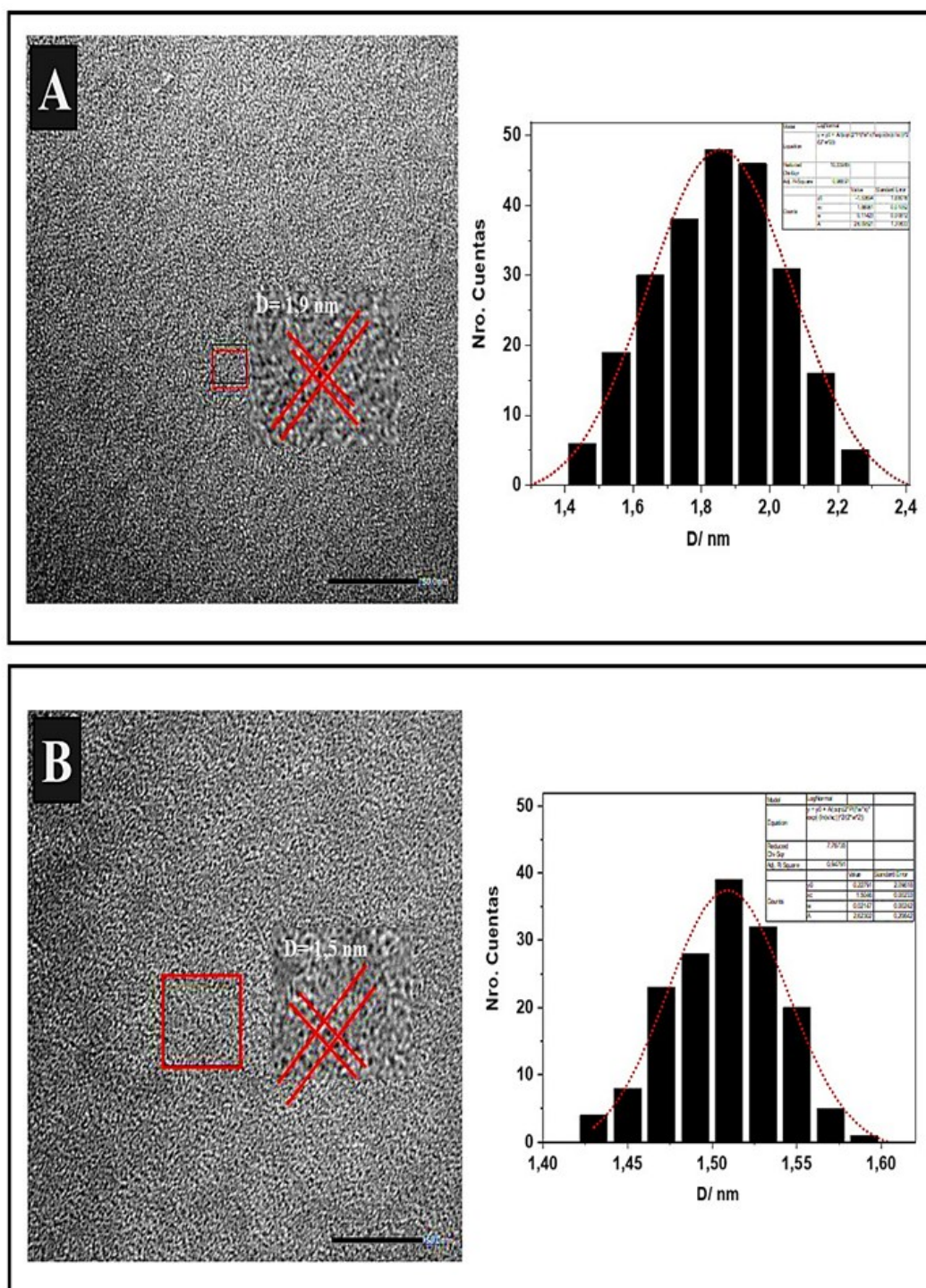
Estos resultados confirman que tanto el MPA como el MES son estabilizadores de los puntos cuánticos de CdSe y se encuentran presentes en su superficie. Se obtuvieron resultados similares para puntos cuánticos de CdSe sintetizados utilizando relaciones molares MPA/MES de 30/70 y 150/0.



**Figura 58.** Espectros FT-IR de los puntos cuánticos de CdSe con relaciones molares MPA/MES de 50/50 (—) y de 100/0 (—), así como también para los estabilizantes puros MPA (—) y MES (—).

Como otra medida de caracterización morfológica, se realizó microscopía de transmisión electrónica (TEM), así como también para corroborar los tamaños de los puntos cuánticos de CdSe determinados mediante los métodos ópticos descritos previamente.

La Figura 59 muestra las imágenes TEM para los puntos cuánticos de CdSe sintetizados con relaciones MPA/MES 30/70 y 100/0, respectivamente.



**Figura 59.** Imágenes TEM para los puntos cuánticos de CdSe sintetizados a relaciones molares MPA/MES 30/70 (A) y 100/0 (B), respectivamente. A la derecha se muestra la distribución poblacional por tamaño de los puntos cuánticos CdSe.

Las imágenes muestran una distribución uniforme de tamaño de los puntos cuánticos de CdSe para ambas relaciones de MPA/MES. Cabe resaltar la ausencia de aglomerados en

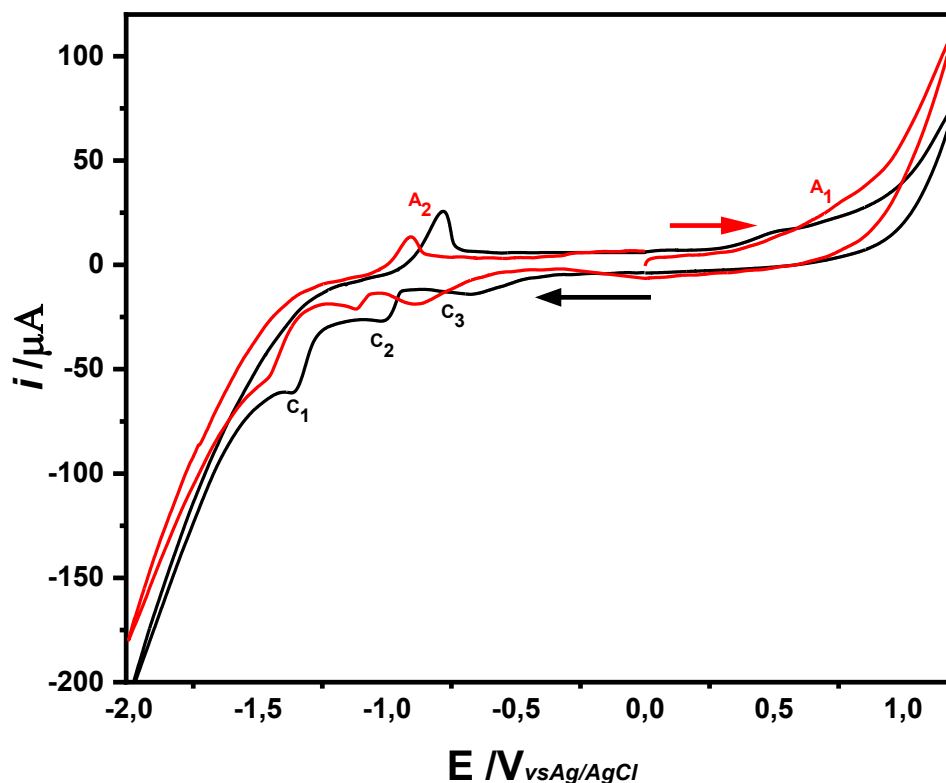
las imágenes, dando cuenta de la estabilidad de las dispersiones de los puntos cuánticos. Cuando la relación MPA/MES es de 100/0 el diámetro obtenido fue de 1,5 nm, mientras que cuando la relación fue 30/70 el diámetro fue 1,9 nm, valores que concuerdan muy bien con los diámetros obtenidos por las técnicas espectrofotométricas.

Sin embargo, es importante destacar que las técnicas espectroscópicas tienden a sobrestimar ligeramente el tamaño debido a su sensibilidad a poblaciones de mayor tamaño y al efecto de colas de absorción asociadas a estados trampa o dispersión del tamaño. En cambio, el análisis por TEM permite observar directamente la distribución morfológica, revelando una dispersión más estrecha en el sistema 100/0, lo cual es consistente con su comportamiento óptico y lumínico más definido.

### **17.3. Caracterización electroquímica y electroquimioluminiscente de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe**

La exploración de las propiedades electroquímicas de los QD de CdSe fue otro de los estudios desarrollados para su caracterización en medio acuoso. A través de este estudio se buscó identificar cómo varían los potenciales de oxidación y reducción en función de la relación de MPA/MES, e identificar los QD de CdSe con la mejor respuesta electroquimioluminiscente para aplicaciones en detección analítica.

En primera instancia, a través de las técnicas de voltamperometría cíclica y cronoamperometría, se estudió el comportamiento electroquímico de los QD de CdSe utilizando electrodos impresos de carbono en soluciones tampón fosfato a valores de pH entre 5,8 - 12. Para ello, se adsorbieron 40  $\mu$ L de la solución de QD de CdSe sobre el EIC, y se realizó voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido de 0,05 V/s. La Figura 60 muestra los voltamperogramas cíclicos de los QD CdSe MPA/MES 30/70 en solución tampón pH 5,8, medidos en dirección anódica y catódica (línea negra).



**Figura 60.** Voltamperogramas cíclicos de puntos cuánticos de CdSe MPA/MES 30/70 registrados en una solución tampón de fosfatos, pH 5,8. La flecha indica la dirección de barrido de potencial.  $v$ : 0,05 V/s.

En solución tampón de fosfato de pH 5,8, al realizar el barrido anódico (línea roja) aparece un pico de oxidación irreversible, denominado  $A_1$ , a 0,810 V. Este pico se corresponde a la inyección de  $n$  huecos en la BV del QD. Al invertir el barrido de potencial no se observó el pico de reducción complementario del producto formado en  $A_1$ , indicando la naturaleza irreversible de proceso de oxidación. Sin embargo, en la región de potenciales negativos se observaron tres picos de reducción denominados  $C_3$ ,  $C_2$  y  $C_1$  que comienzan en -0,801 V. Estos picos se corresponden a inyecciones de  $e^-$  en la BC, relacionados a la reducción del  $Cd^{2+}$  en la estructura cristalina. Cuando el barrido de potencial se invierte, aparece el pico de oxidación complementario  $A_2$  a -0,910 V. Al iniciar el barrido de potencial en dirección catódica (línea negra) se encontraron los tres picos de reducción ( $C_3$ ,  $C_2$  y  $C_1$ ) a valores de potencial menos catódicos, con su correspondiente pico de oxidación  $A_2$  al invertir el potencial. El pico  $C_1$  se debe a la inyección de electrones en la BC, con un valor de -1,43 V. Los picos  $C_2$  y  $C_3$  se debieron a la inyección de electrones en estados trampa de menor energía con respecto a la BC<sup>289,290</sup>.

Todas las demás síntesis de puntos cuánticos de CdSe con relaciones molares MPA/MES 50/50, 100/0 y 150/0 mostraron el mismo comportamiento bajo las condiciones de pH estudiadas. Además, se realizaron voltamperogramas cíclicos de los puntos cuánticos sintetizados para las diferentes relaciones molares de MPA/MES en soluciones de pH 7,9, 10 y 12. El comportamiento electroquímico, para todos los pH analizados, fue similar al descrito, sin embargo, como es de esperar, la diferencia de los potenciales de pico fueron dependientes del pH de la solución.

La diferencia entre los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) correspondientes a  $A_1$  ( $E_{A1,p}$ ) y  $C_1$  ( $E_{C1,p}$ ) para las síntesis de QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50 y 100/0, se muestran en la Tabla 8, y representa la diferencia de energía entre las bandas de valencia y conducción, siendo estas síntesis las de mayor relevancia en los estudios electroquímicos.

**Tabla 8.**  $\Delta E_p$  obtenidos a diferentes valores de pH para las síntesis de QD CdSe a distintas relaciones molares MPA/MES.

| Relación molar MPA/MES |                  | pH 5,8 | pH 7,9 | pH 10,0 | pH 12,0 |
|------------------------|------------------|--------|--------|---------|---------|
| 30/70                  | $\Delta E_p / V$ | 1,68   | 1,63   | 1,48    | 1,44    |
| 50/50                  | $\Delta E_p / V$ | 1,91   | 1,84   | 1,73    | 1,62    |
| 100/0                  | $\Delta E_p / V$ | 2,16   | 2,01   | 1,75    | 1,68    |

Para todas las relaciones molares de MPA/MES descritas en la Tabla 8,  $E_{A1,p}$  disminuyó y  $E_{C1,p}$  se volvió menos negativo con el aumento del pH, por lo tanto,  $\Delta E_p$  disminuyó. Los cambios en  $\Delta E_p$  en función del pH fueron menos significativos para los QD de CdSe estabilizados con una proporción molar de MPA/MES de 30/70 debido a una menor concentración superficial de MPA. Estos resultados son consistentes con el valor de pKa (4,34) del grupo carbonilo del MPA y la alta concentración de MPA en la superficie del nanocrystal, donde a un pH inferior a 8 el equilibrio de protonación comienza a afectar la carga superficial de los nanocristales. Por otra parte,  $\Delta E_p$  disminuye al aumentar la concentración de MES.

A partir de los valores de  $\Delta E_p$  se determinó el ancho de banda prohibida de los QD de CdSe, teniendo en cuenta los procesos electroquímicos y las interacciones superficiales del nanocrystal. El valor de  $\Delta G_{\text{redox}}^s$  corresponde a la energía libre de Gibbs de los QD de CdSe en solución, o descrito de otra manera, es la energía libre por mol de sustancia que sufre el proceso de transferencia electrónica, en este caso los QD de CdSe. La energía libre de Gibbs en QDs se encuentra directamente relacionada a los procesos energéticos que ocurren tanto en el núcleo del nanocrystal, así como también los procesos superficiales; por ello, se puede estimar el valor de  $\Delta G_{\text{redox}}^s$  a partir de la diferencia energética de los procesos ópticos que ocurre en el núcleo y los procesos electroquímicos propios de la superficie del nanocrystal, mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{redox}}^s = nF(\Delta E_p) - E_{0-0} - \frac{N_A e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{\text{CdSe}}R} \quad (40)$$

donde el termino  $nF(\Delta E_p)$  es la energía utilizada o consumida en un proceso redox a partir de la diferencia de energía entre las BV y BC, indicando la energía necesaria para que ocurra la transferencia de electrones.  $E_{0-0}$  es la energía mínima del estado singlete. El último término de la ecuación hace referencia al cambio de energía libre debido a la interacción electrostática de cargas opuestas (carga del electrón) desde una distancia infinita hasta donde ocurre la transferencia de electrones. En este caso el acercamiento de cargas en el medio en donde ocurre la reacción con el nanocrystal, en donde  $N_A$  es el número de Avogadro,  $e$  es la carga del electrón en unidades energéticas,  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica en el vacío,  $\epsilon_{\text{CdSe}}$  es la constante dieléctrica del QD CdSe en agua,  $r$  es el radio de la esfera de solvatación del nanocrystal en la solución, el cual para nanocristales con diámetros menores a 3 nm, tiene un valor estándar de 7 Å.

Esta ecuación tiene en cuenta los efectos del confinamiento cuántico y la interacción  $h^+ - e^-$  del semiconductor, por lo que, a partir de ella se puede determinar el valor de  $E_g$ . Se puede relacionar la energía libre de Gibbs como la diferencia entre la variación de potenciales de picos de oxidación y de reducción del semiconductor frente al potencial del electrodo de referencia, a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{redox}}^s = E_{\text{electrodo}} - \Delta E_p \quad (41)$$

donde el termino  $E_{\text{electrodo}}$  es el potencial en el que ocurre el proceso redox, dependiendo del electrodo de referencia usado. En este caso, se utilizó un electrodo de Ag/AgCl sat.

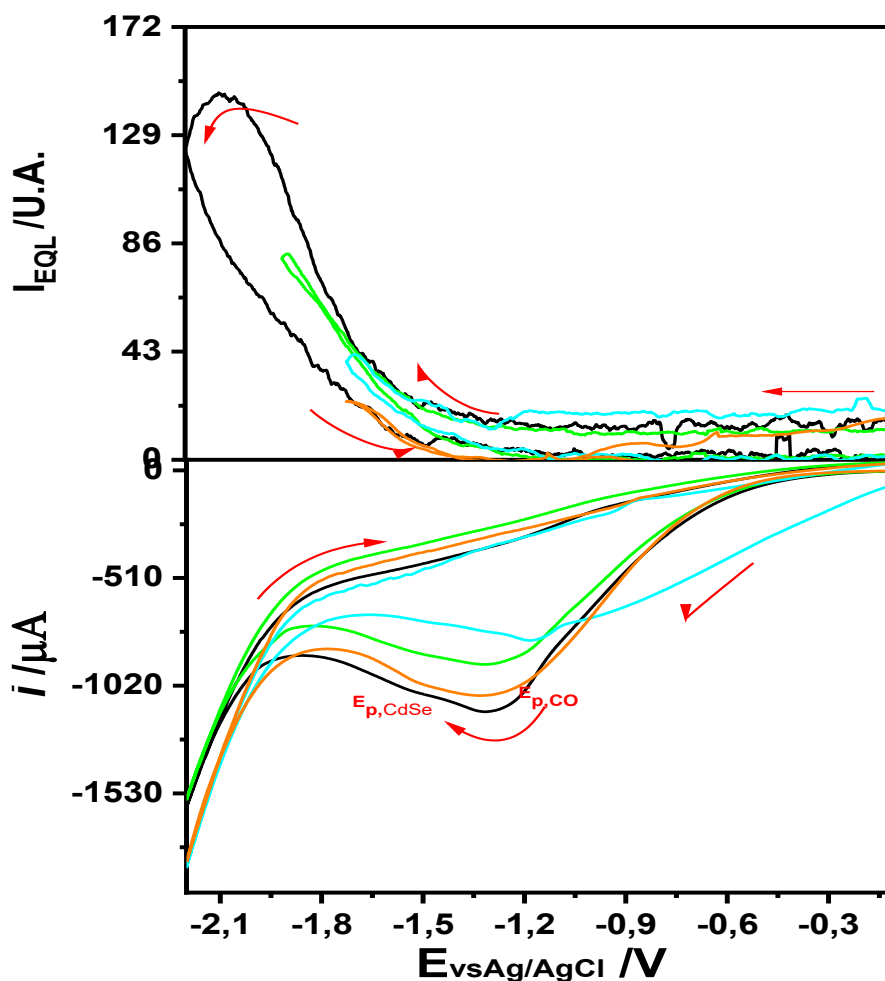
NaCl 3 M como electrodo de referencia, el cual tiene un potencial de 0,124 V vs. ENH. En procesos electroquímicos, el valor de  $E_g$  se puede aproximar a  $\Delta E_p$  ( $\Delta E_p \cong E_g$ ) Para un electrodo de referencia Ag/AgCl sat. NaCl 3 M, el potencial de referencia en el vacío es aproximadamente 4,7 eV. Así, el valor de  $E_g$  se puede estimar como:

$$E_g(\text{eV}) = (E_{p,a} + 4,7)\text{eV} - (E_{p,c} + 4,7)\text{eV} \quad (42)$$

Los valores de  $\Delta E_p$  concuerdan muy bien con los valores de  $E_g$  obtenidos por el método Tauc expuestos en la Tabla 5. La diferencia entre  $\Delta E_p$  y  $E_g$  se debe a que las reacciones electroquímicas que tienen lugar en la superficie de los QD de CdSe, mientras que las excitaciones ópticas que se producen en el núcleo de los QD de CdSe.

La caracterización electroquimioluminiscente de los QDs de CdSe se realizó apoyada en la información proporcionada en la literatura<sup>291</sup>. Para ello, el proceso electroquimioluminiscente se llevó a cabo por la vía coreactante, debido a la naturaleza de los QDs sintetizados. Los puntos cuánticos de CdSe no generan EQL por vía de aniquilación, debido a la ineficiencia en la recombinación entre sus especies oxidadas y reducidas<sup>292</sup>.

Inicialmente se estudió la generación de la EQL de los QD CdSe en la región catódica, utilizando como coreactante persulfato de potasio, el cual cuando se reduce, se descompone generando un radical fuertemente oxidante. Para este estudio se prepararon soluciones de 100  $\mu\text{L}$  a partir de 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  0,1 M en solución tampón de fosfato salino, pH 7,5 + 30  $\mu\text{L}$  de los QD de CdSe purificados. Las mediciones se realizaron agregando un volumen de 40  $\mu\text{L}$  de la solución en la celda uStat ECL, de DropSens. La Figura 61 muestra los voltagramas cíclicos en función de curvas corriente vs. potencial e intensidad de EQL vs. potencial obtenidos para las síntesis de QD de CdSe a distintas relaciones molares MPA/MES.



**Figura 61.** Voltamperogramas cíclicos de EQL vs. E (arriba), y  $i$  vs. E (abajo) para QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—), 100/0 (—) y 150/0 (—), medidos en solución tampón fosfato, pH 7,5 en presencia de  $S_2O_8^{2-}$  0,1 M, a una velocidad de barrido de  $0,5 \text{ V s}^{-1}$ . Las flechas rojas indican el barrido de potencial.

De los voltamperogramas cíclicos de barrido de potencial en función de la corriente, se aprecia una gran corriente catódica, la cual es debida a la reducción de los QD de CdSe y, mayoritariamente, del coreactante, el que se encuentra a una concentración de 0,1 M. Se pueden observar los potenciales de pico  $E_{p,CO}$  y  $E_{p,CdSe}$  relacionados con los potenciales de pico catódico del coreactante, y de la inyección de electrones en la BC de los QD, respectivamente.

El  $E_{p,CO}$  fue cercano a 1,050 V, mientras que  $E_{p,CdSe}$  varió de acuerdo con la relación molar de los estabilizantes MPA/MES manteniendo el comportamiento descrito

previamente. Para todos los casos, se observa que la emisión electroquimioluminiscente inició cuando el barrido de potencial llegó a un potencial de  $-1,450$  V logrando su máximo valor de intensidad en un potencial cercano a  $-1,700$  V. Nótese que cuando el barrido de potencial se invirtió, la intensidad de EQL decae hasta alcanzar el valor de partida.

De acuerdo con los valores de intensidad EQL, el QD MPA/MES CdSe, con relación 30/70 MPA/MES fue el que registró mayor intensidad de emisión EQL; por su parte, los QD con relación molar MPA/MES 50/50 mostró una intensidad EQL menor. Para la relación de MPA/MES 100/0, la señal disminuyó cerca del 71,25 % en comparación con una relación molar de MPA/MES de 30/70. Caso similar se mostró con los QD de CdSe con ausencia de MES, y con un incremento de la concentración de MPA (MPA/MES 150/0), razón por la que se descartó para su estudio y aplicación.

El proceso de quimioluminiscencia electrogenerada tiene lugar desde el nivel borde de banda, pero fundamentalmente en estos QDs, desde los estados de trampa superficiales, en donde la brecha de banda se ve fuertemente afectada por la presencia de estados superficiales no pasivados que actúan como trampas locales para electrones y huecos.

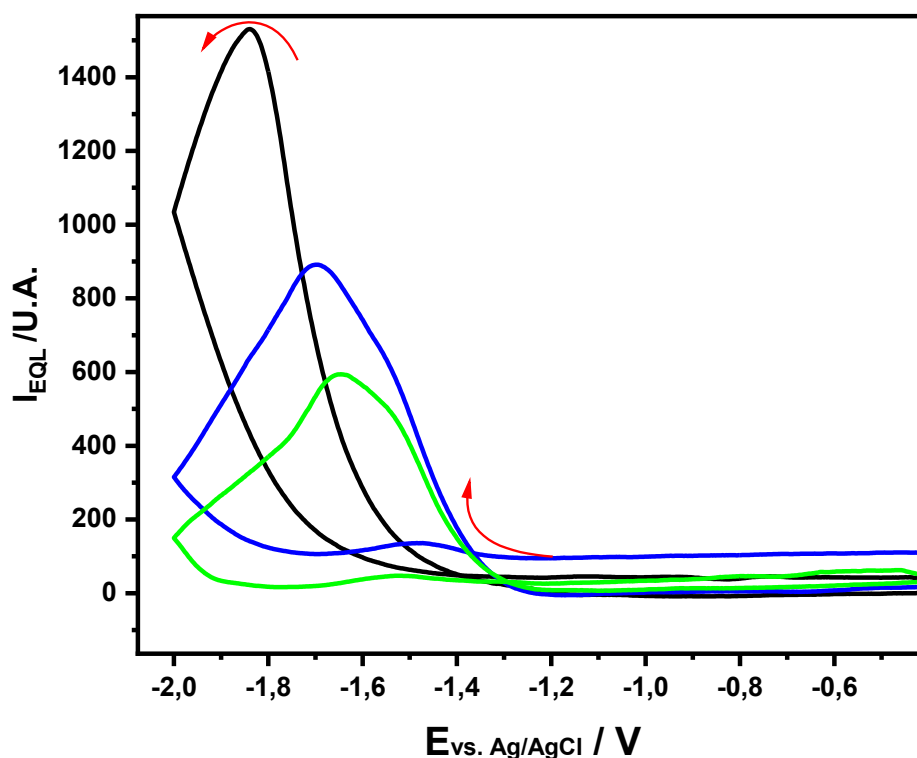
El grupo sulfonato del MES forma un complejo con  $\text{Cd}^{+2}$  en la superficie de los QD de CdSe, el que es menos estable que el enlace S-Cd formado entre el MPA y el Cd. Un aumento de MES en la relación molar de MPA/MES formará un recubrimiento más heterogéneo de la superficie de QD CdSe. La permeabilidad del recubrimiento producido por MES en el estabilizador dual favorece el proceso de inyección de electrones a través de la reacción de transferencia de electrones heterogénea y la pérdida de electrones a través de una reacción de fase homogénea, lo que origina una emisión electroquimioluminiscente mejorada respecto a los QD de CdSe con menor contenido de MES en el capping. Estos resultados contrastan con los encontrados en experimentos de fotoluminiscencia, donde se observan rendimientos cuánticos de fluorescencia más altos utilizando MPA solo como estabilizador.

De acuerdo con los resultados obtenidos y lo reportado en las referencias bibliográficas consultadas, se describe un posible mecanismo de reacción<sup>293</sup>:



En la reacción (43) se produce la reacción heterogénea del dianión persulfato formando un trianión radical persulfato, el cual es muy inestable, por lo que se descompone en un anión radical sulfato altamente oxidante, y un dianión sulfato (44). La ecuación (45) representa la formación anión radical del QD de CdSe a partir de la reducción electroquímica. En cercanía del electrodo, el radical de QD formado  $\text{CdSe}^{\bullet -}$  reacciona con el  $\text{SO}_4^{\bullet -}$  quien le sustrae un electrón desde su BV generando un hueco. De esta manera se forma la especie excitada  $\text{CdSe}^*$ , el que posee el par  $h^+ - e^-$ , responsable de la emisión de la luz al regresar a su estado fundamental.

Adicionalmente al estudio de EQL de los Q MPA/MES CdSe en solución, se realizaron mediciones de la emisión EQL de los QD adsorbidos en la superficie de los EIC. Para ello, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de QD de CdSe sobre la superficie del EIC, y la gota se secó en una estufa a 40 °C durante 30 min. A continuación, el EIC modificado se lavó con una solución tampón de fosfato, pH 7, y se introdujo en la celda. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0,1 M, preparada en solución tampón de fosfato, pH 7,5. Los resultados de la emisión electroquimioluminiscente obtenida para las síntesis con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50 y 100/0 se muestran en la Figura 62.



**Figura 62.** Voltamperogramas cíclicos de EQL vs. E para QD de CdSe absorbidos en EIC, con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—) y 100/0 (—), en presencia de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  0,1 M medidos a una velocidad de barrido de 0,5 V/s. Las flechas rojas indican el barrido de potencial.

A diferencia de los resultados obtenidos para QD en solución, la intensidad de EQL para los QD de CdSe adsorbidos en la superficie de los EIC aumentó significativamente, debido a la eficiencia aumentada de la transferencia de electrones, la alta concentración local de especies reactivas, y la reducción por difusión de las especies electrogeneradas<sup>294</sup>.

Nótese además que el pico máximo de emisión de EQL para cada QD de CdSe se encuentra bien definido permitiendo observar el comportamiento de emisión de los QD en relación con el barrido de potencial catódico. El QD de CdSe con relación MPA/MES 30/70, fue quien presentó la mayor intensidad de emisión, mientras que el QD con relación molar MPA/MES 100/0 presentó la más baja EQL, manteniendo el comportamiento previamente mencionado. Estos resultados se asemejan a un espectro de emisión EQL ofreciendo información de la cinética del mecanismo, así como también de la relación de la difusión de las especies en solución con la transferencia de electrones y

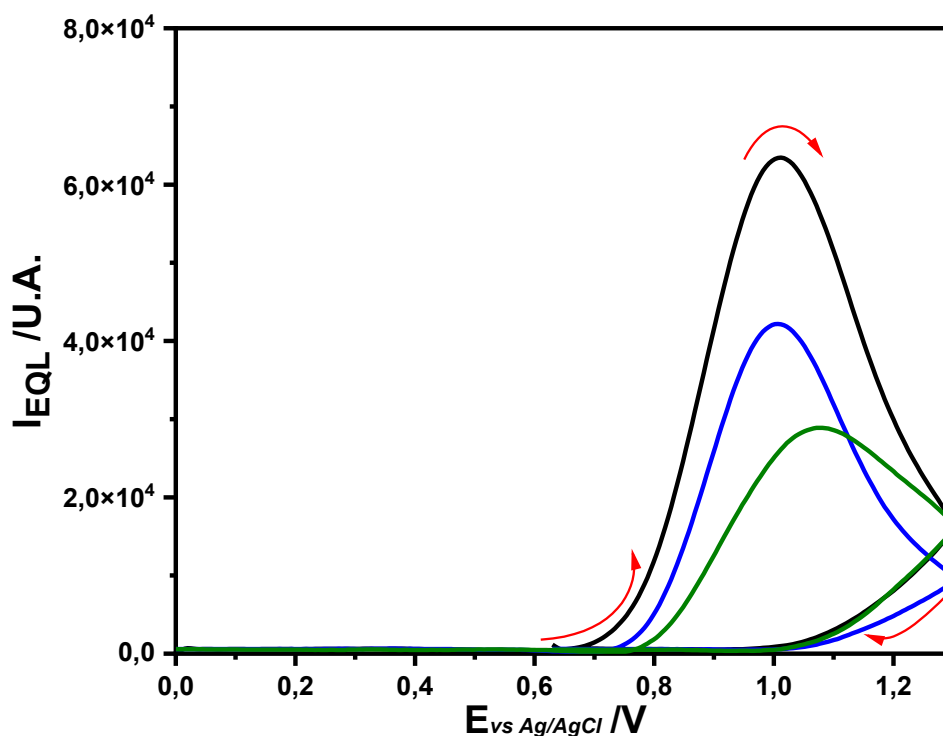
huecos. Los  $E_p$  para cada máximo de EQL fueron iguales a las determinadas para los QD en solución.

Por otro lado, se exploró la EQL a partir de barridos de potenciales anódicos para las síntesis con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50 y 100/0. De acuerdo con la literatura, se encontró la tripropilamina (TPrA) como coreactante de mayor aplicación, por lo que para este estudio se utilizó una solución de TPrA 25 mM en solución tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4. Se descartó el uso de EIC para los estudios de EQL anódico debido a varios factores como la ventana de potencial del carbono en soluciones acuosas (limitada a 1,2 V), la alta degradación de la superficie carbonosa del EIC en presencia de una solución con alto contenido de TPrA.

De acuerdo con esto, se utilizaron electrodos ITOs para los estudios de EQL anódica. La Figura 63 muestra los voltamperogramas de EQL anódica para los QDs con relaciones molares MPA/MES de 30/70, 50/50 y 100/0.

Los máximos de intensidad de emisión se ubicaron cerca de 1,050 V para todas las relaciones molares analizadas. Sin embargo, se detectó un ligero desplazamiento del máximo de EQL hacia potenciales más anódicos a medida que aumenta la proporción de MPA en el estabilizante. Este fenómeno sugiere que un capping estabilizante más compacto dificulta la transferencia electrónica.

Al igual que en la región catódica, la relación molar MPA/MES 30/70 mostró la mayor intensidad de EQL, mientras que la menor emisión en el barrido anódico se registró para la relación molar MPA/MES 100/0. Cabe destacar que los valores de intensidad de EQL en la región anódica fueron del orden de  $10^4$  UA, mientras que en la región catódica fueron del orden de  $10^3$  UA. Esto indica que, en el proceso anódico, la recombinación entre electrones y huecos es más eficiente en comparación con el proceso catódico. Esta diferencia podría atribuirse a una mayor estabilidad de las especies involucradas en la reacción anódica.



**Figura 63.** Voltamperogramas cíclicos anódicos de EQL de los QD de CdSe con relaciones molares MPA/MES 30/70 (—), 50/50 (—) y 100/0 (—), medidos en solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, en presencia de TPrA 21 mM como coreactante a una velocidad de barrido de  $0,5 \text{ V s}^{-1}$ . Las flechas rojas indican el barrido de potencial.

El mecanismo de generación de EQL anódica, así como también los procesos cinéticos electroquímicos son los siguientes:



En el primer paso (ecuación (48)), el coreactante TPrA sufre una oxidación electroquímica en el electrodo, generando un radical catiónico  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  que se descompone en el radical libre  $\text{TPrA}^{\bullet}$ . Luego, el CdSe se oxida (ecuación (49)) formando una especie oxidada  $n\text{CdSe}^{\bullet+}$ .

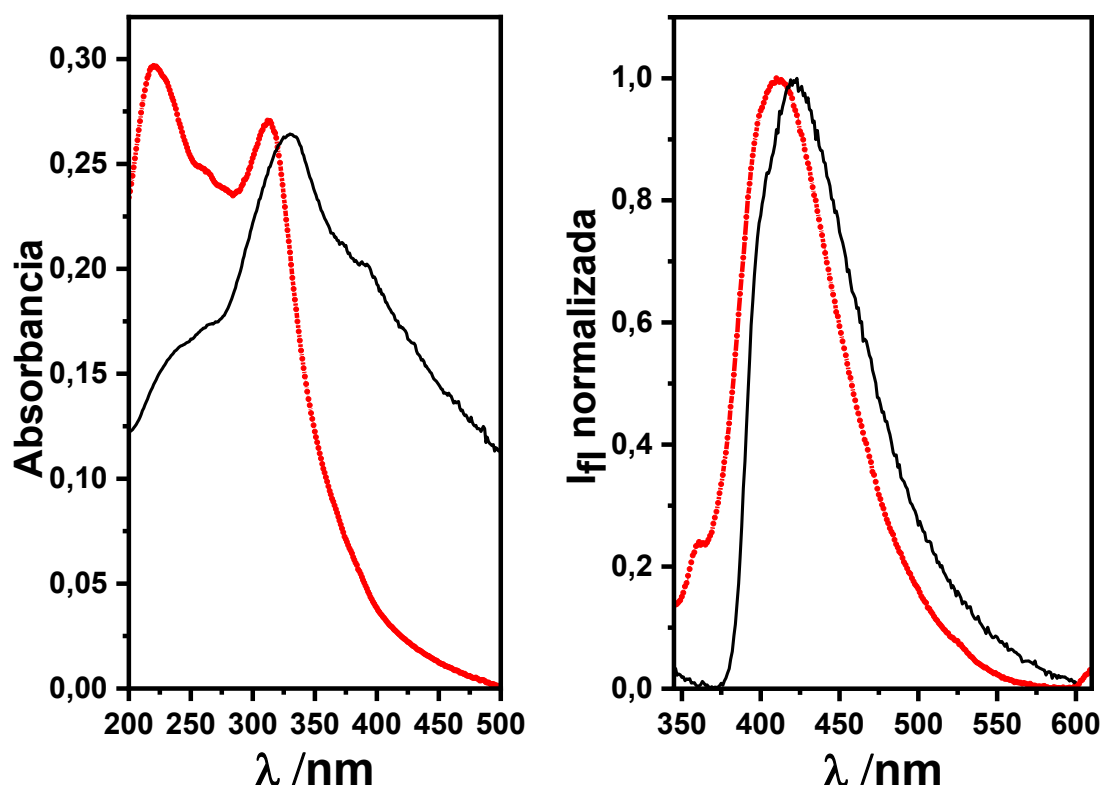
El QD oxidado reacciona con el radical  $\text{TPrA}^\bullet$  en una transferencia de electrones, generando el estado excitado  $\text{CdSe}^*$  junto con la especie inerte  $\text{Im}^+$ . Finalmente, el QD excitado decae a su estado basal emitiendo un fotón (ecuación (51)), lo cual da lugar al fenómeno de EQL.

## **18. Caracterización de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES $\text{CdSe}@g\text{-C}_3\text{N}_4$**

Una vez estudiada la síntesis y caracterización de los QD de CdSe, se realizó la síntesis de un compuesto formado por los mismos QD y nitruro de carbono grafitico ( $g\text{-C}_3\text{N}_4$ ) con el objetivo de generar una heteroestructura para el desarrollo de sensores electroquimioluminiscentes. Los estudios de caracterización de las propiedades ópticas, morfológicas, electroquímicas y electroquimioluminiscentes de las heteroestructuras conjugadas, tuvieron como objetivo maximizar la EQL. Uno de los propósitos de estas heteroestructuras conjugadas formadas a partir de QD de CdSe y el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ , fue analizar la variación en la intensidad de emisión de EQL de los luminóforos cuando se encontraban en cercanía entre sí.

Se estudiaron las condiciones que podrían influir en la emisión de EQL, analizando la interacción entre los QD de CdSe y el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ , así como el impacto de esta heterounión en los mecanismos de transferencia energética, transferencia electrónica y modulación de la señal electroquimioluminiscente.

Inicialmente se realizaron los estudios de análisis y caracterización de las propiedades del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  lo cual permitió identificar las condiciones óptimas para la síntesis de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES  $\text{CdSe}@g\text{-C}_3\text{N}_4$ . Se preparó una solución de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  pesando 5 mg del nanomaterial y disolviéndolo en 2 mL de agua bidestilada; la concentración final para esta solución fue de 2,5 mg/mL de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ , siendo ésta la solución patrón de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  utilizada. Se midieron los espectros de absorción y emisión de fluorescencia para dos muestras de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ , una correspondiente al  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  sintetizado sin exfoliar y otro exfoliado. Los resultados se presentan en la Figura 64.



**Figura 64.** Espectros de absorción e intensidad de fluorescencia normalizado para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado (línea roja) y sin exfoliar (línea negra).  $\lambda_{exc}$  = 320 nm.

Al comparar los espectros de absorción y emisión de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> sin exfoliar y del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> sometido a exfoliación química, se observa que la banda de absorción cercana a 220 nm en el nanomaterial sin exfoliar no está definida, a diferencia del espectro correspondiente al material exfoliado. Además, el proceso de exfoliación genera un ligero desplazamiento hacia el azul en el máximo de emisión de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado en comparación con el material sin tratamiento.

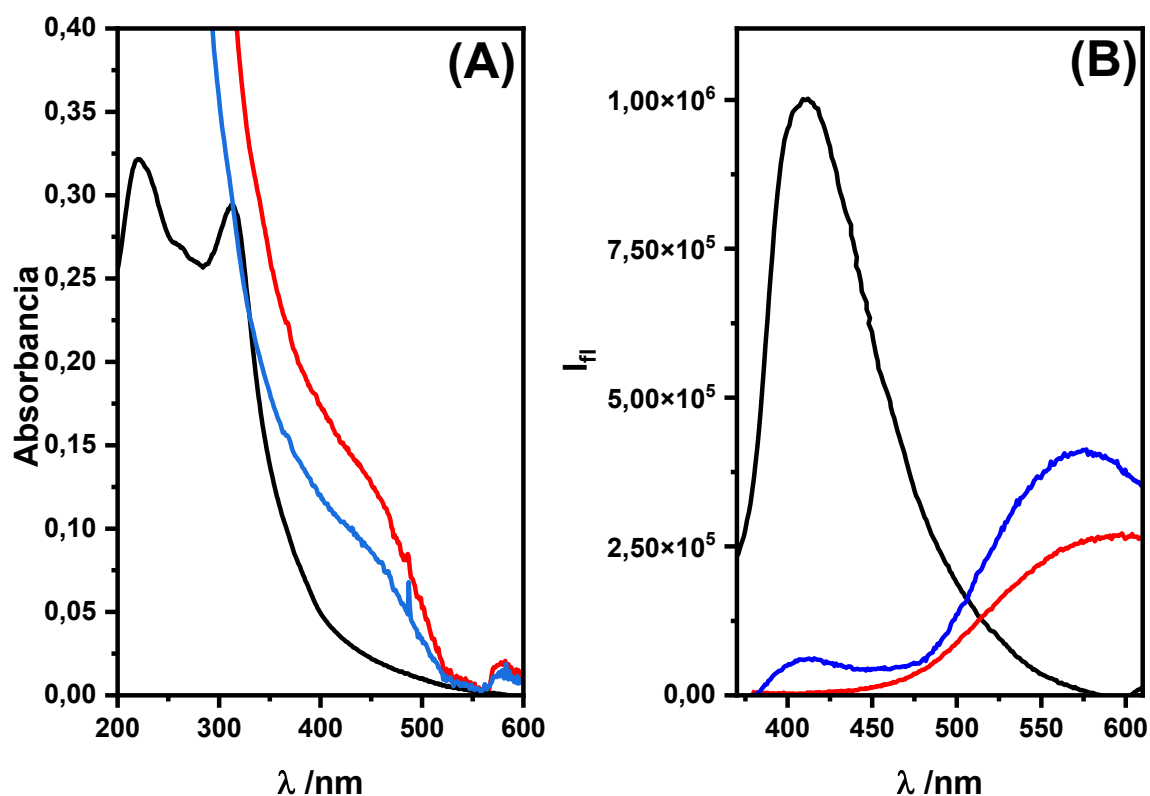
Estos resultados sugieren que, en la exfoliación, al separar las láminas de la estructura gráfica, se favorecen los procesos de absorción de energía a partir de la aparición de una banda a 220 nm como también de los desplazamientos de los máximos de absorción y emisión a menores longitudes de onda. Del espectro de absorción del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, se observa una banda ancha con dos picos pronunciados a 225 nm y 312 nm. La primera banda puede ser atribuida a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  propia del doble enlace C – N. Esta banda se ve afectada cuando existe una superposición de láminas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, razón por la cual no aparece en el material sin exfoliar. El segundo pico de absorción se corresponde

a una transición  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>295</sup> El espectro de fluorescencia, cuando la excitación es realizada a 320 nm, muestra una banda angosta con una intensidad máxima de emisión a 414 nm. Este comportamiento es característico de materiales basados en g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Para la síntesis de las heteroestructuras conjugadas, así como también en los estudios del inmunosensor electroquimioluminiscente, se utilizó g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado.

### **18.1. Determinación de la concentración de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en la síntesis de las heteroestructuras conjugadas con MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>**

Tal y como se ha reportado en estudios e investigaciones previas de síntesis y caracterización de heteroestructuras conjugadas, la integración de QD de CdSe estabilizados con MPA/MES (relación 30/70) acoplados con nitruro de carbono grafitico (MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) es una integración de nanomateriales capaz de mejorar la separación de cargas fotoinducida, la eficiencia de emisión y la respuesta electroquimioluminiscente, siendo una propiedad con múltiples aplicaciones y usos en sensores y biosensores. Como parte inicial del estudio y caracterización de las heteroestructuras conjugadas sintetizadas, se realizaron los espectros UV-Vis y emisión de intensidad de fluorescencia, para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, los QD MPA/MES CdSe y la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> tal y como se muestran en la Figura 65.

Para el caso del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, el espectro de absorción mostró las bandas características del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> tal y como se describió en los estudios previos<sup>296</sup>. Los espectros de absorción correspondientes al QD MPA/MES CdSe y la heteroestructura conjugada CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> mostraron la banda característica de los QD CdSe con un máximo de absorción cercano a 435 nm. Sin embargo, en la heteroestructura conjugada la banda de absorción característica del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> no se observa, debido a la baja concentración de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con respecto a la alta concentración del QD MPA/MES CdSe sobre las nanolaminas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. En cuanto a la emisión de fluorescencia, cuando las soluciones de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y de puntos cuánticos MPA/MES CdSe se excitaron a 320 nm, los espectros presentaron una banda simétrica centrada en 414 nm y 598 nm, respectivamente<sup>297</sup>. Para las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se observaron dos bandas, correspondientes al g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los QD MPA/MES CdSe, respectivamente.



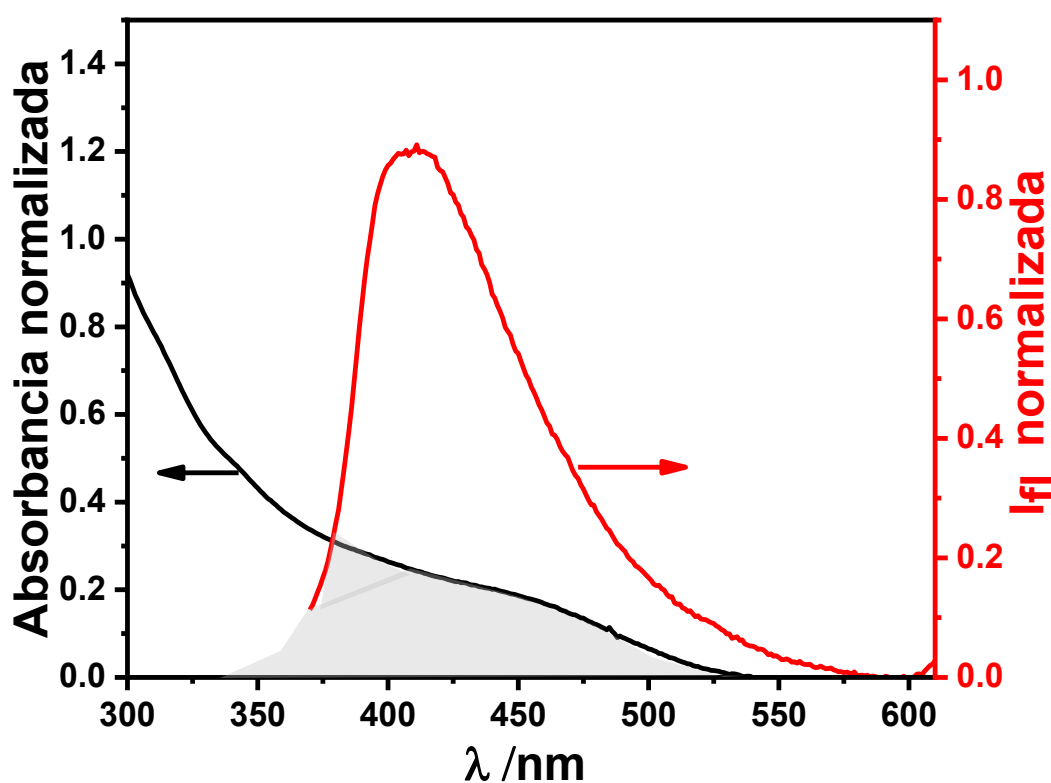
**Figura 65.** Espectros de absorción (A) e intensidad de fluorescencia en solución acuosa corregidos por absorción (B) para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), MPA/MES CdSe (—) y MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—).  $\lambda_{exc}=320$  nm.

Sin embargo, se observó una disminución del 94 % de la intensidad de la fluorescencia correspondiente con la banda de intensidad del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, y un aumento del 54 % correspondiente a la banda de los QD MPA/MES CdSe presentes en la heteroestructura, teniendo en cuenta que las concentraciones de nitrato tanto en la solución con la heteroestructura así como en el nitrato exfoliado analizado son iguales, así como también considerando que los QD MPA/MES CdSe fueron sintetizados con iguales concentraciones, tanto en ausencia, como en la formación de la heteroestructura conjugada. Es de suponer que no todos los puntos cuánticos se formaron sobre las nanolaminas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, sino que parte de los nanocristales se sintetizaron en la solución. No obstante, luego de purificar la heteroestructura, se obtuvo un aumento de la emisión de los QD de CdSe.

Al analizar el espectro de emisión del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y el espectro de absorción de los QD de CdSe, como se observa en la Figura 66, se observa una superposición espectral entre la banda de absorción de los puntos cuánticos (línea negra) y la banda de emisión del g-

C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (línea roja), lo que podría dar lugar a un proceso de transferencia de energía entre ambas nanoestructuras<sup>298</sup>.

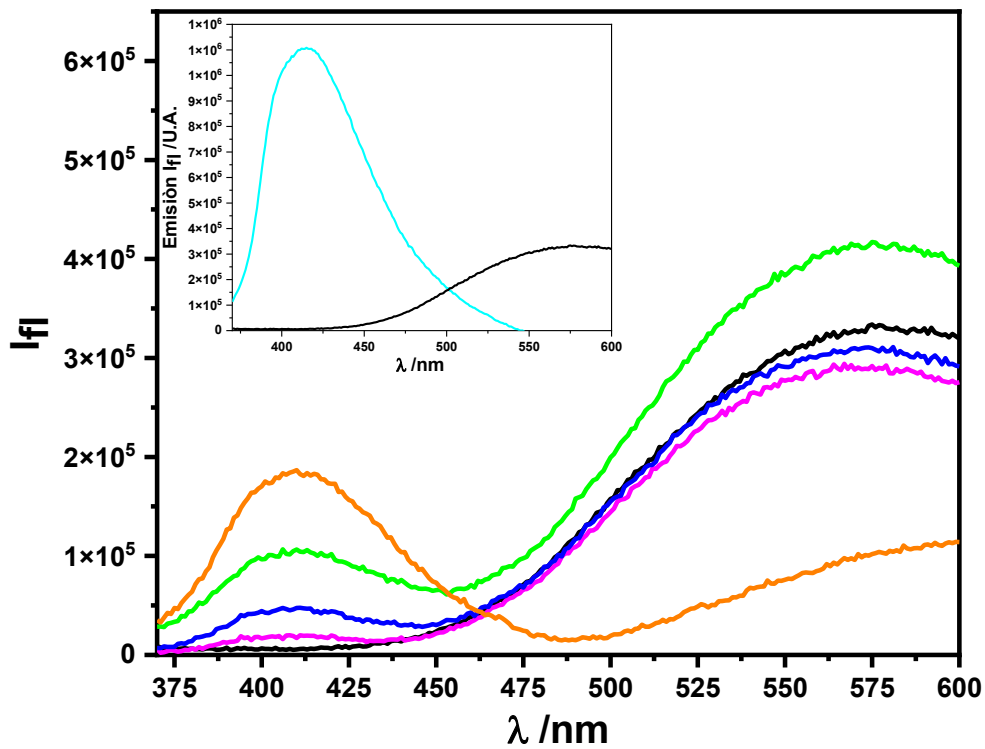
Bajo estas condiciones, y a partir de los resultados obtenidos para la emisión de fluorescencia de la heteroestructura mostrados en la Figura 65, se puede inferir que existe un proceso RET, donde el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> actúa como dador de energía y los QDs de CdSe como aceptor de energía. La presencia de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en la heteroestructura facilita el movimiento efectivo de los portadores de carga hacia los QD de CdSe, lo que mejora su emisión. Este proceso promueve los procesos radiativos de los QD de CdSe<sup>299</sup>.



**Figura 66.** Gráfico de absorción de los QD MPA/MES CdSe (—) y emisión de fluorescencia de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—). En sombreado la región de superposición espectral.

Para el desarrollo de las síntesis de las heteroestructuras conjugadas a partir de los QD de CdSe y el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> fue de suma importancia conocer la proporción molar a utilizar de cada nanomaterial. Teniendo en cuenta los resultados de caracterización óptica y electroquímica de los QD de CdSe y del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, se realizó un estudio de la concentración de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para la formación de las heteroestructuras conjugadas, por lo

que se realizaron diferentes síntesis con diferentes concentraciones de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, manteniendo constante la concentración de QD de CdSe. Se realizaron agregados de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 400  $\mu$ L de la solución de 2,5 mg/mL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a la solución de precursores de CdSe; las concentraciones finales de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en cada síntesis fueron de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,2 mg/mL, respectivamente. Posterior a la síntesis de las heteroestructuras conjugadas, se realizaron mediciones de la emisión de fluorescencia para determinar la relación óptima entre los QD de CdSe y g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con el objetivo de maximizar el efecto de transferencia de energía. Los resultados se muestran en la Figura 67.



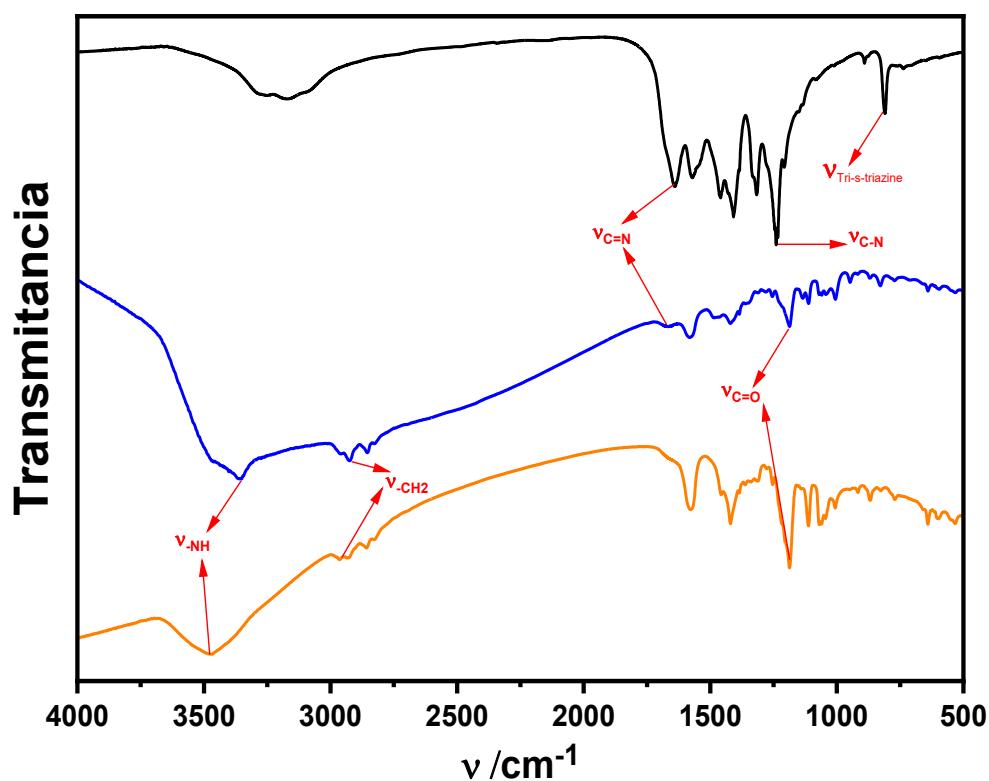
**Figura 67.** Espectros de intensidad de fluorescencia del QD MPA/MES CdSe (—) y de la heteroestructura MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para concentraciones de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de 0,025 (—), 0,05 (—), 0,1 (—) y 0,2 (—) mg/mL, excitados a 320 nm. Inserto: intensidad de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—) y el punto cuántico CdSe.  $\lambda_{exc} = 320$  nm.

Se observó que al aumentar la concentración de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hasta alcanzar 0,1 mg/mL se produjo un aumento en la intensidad de fluorescencia en la región de emisión del QD de CdSe, con un máximo de emisión a 570 nm. Sin embargo, para concentraciones de g-

C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> superiores a 0,1 mg/mL se observó una disminución en la intensidad de emisión. Por lo tanto, se utilizó una concentración 0,1 mg/mL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para todas las mediciones.

## 18.2. Caracterización morfológica de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Con el objetivo de caracterizar la heteroestructura conjugada de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, se realizaron espectros FT-IR para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, los QD de CdSe y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, tal y como se muestra en la Figura 68.

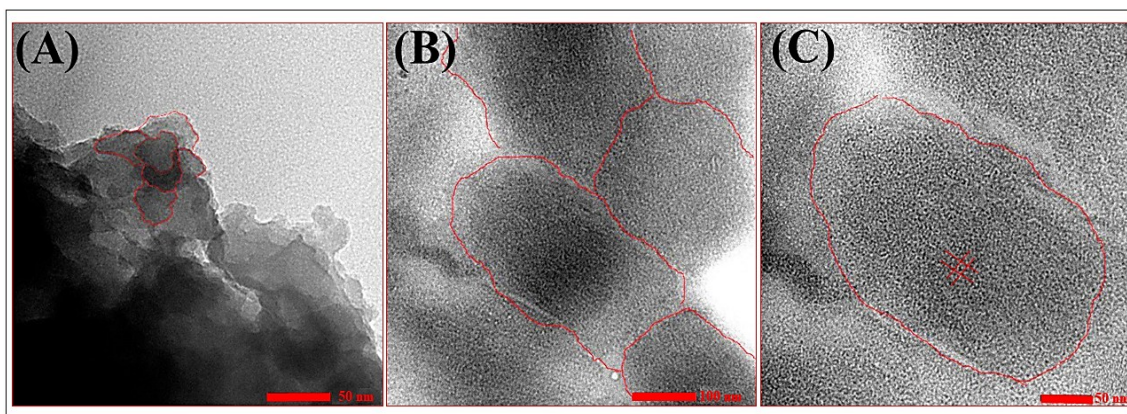


**Figura 68.** Espectros FT-IR para g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), MPA/MES CdSe (—) y MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—)

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado muestra el espectro FT-IR típico, con un pico en 809 cm<sup>-1</sup> característico debido a la presencia de los anillos de triazina. La banda de absorción cerca de 1572 cm<sup>-1</sup> y 1632 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento de C=N, mientras que las bandas a 1235 cm<sup>-1</sup>, 1327 cm<sup>-1</sup> y 1405 cm<sup>-1</sup> corresponden al estiramiento de C-N aromático<sup>300,301</sup>.

En cuanto a los picos que se muestran entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a grupos N-H de los grupos amino concentrados y los grupos O-H adsorbidos respectivamente.

El QD MPA/MES CdSe, como se describió previamente, muestra picos que se encuentran entre el rango de  $770\text{ cm}^{-1}$  a  $796\text{ cm}^{-1}$  atribuidos al modo de vibración de estiramiento del enlace Cd-Se<sup>302</sup>. Los picos en  $1492\text{ cm}^{-1}$  y  $1525\text{ cm}^{-1}$  corresponden a -C=O- y -CO- respectivamente, que se derivan de la introducción del capping de recubrimiento MPA<sup>303</sup>. En lo que respecta al espectro FT-IR de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, se observan los picos en el rango desde  $1572\text{ cm}^{-1}$  hasta  $1632\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes al estiramiento de los enlaces C=N. Sin embargo, las bandas características de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> son de baja intensidad en la heteroestructura debido al bajo contenido de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> frente a la del QD de relación molar 30/70 MPA/MES. Se analizó la morfología de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> mediante TEM. La Figura 69 (A) muestra que el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado presenta una formación en laminas características del nanomaterial. Las Figura 69 (B) y (C) muestra los QD MPA/MES CdSe sobre la superficie del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>; las nanoesferas de CdSe se dispersaron relativamente uniforme en la superficie de las láminas del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Con este resultado se demostró la formación de la heteroestructura MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.



**Figura 69.** Imágenes TEM para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado (A), y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (B) y (C).

Los valores de  $E_g$  de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, y las heteroestructuras conjugadas 30/70, 50/50 y 100/0 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se estimaron mediante el método óptico descrito previamente, considerando que el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, debido a su naturaleza, es un semiconductor de naturaleza indirecta, al igual que las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-

C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. El valor del  $E_g$  determinado para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> fue de 2,55 eV, siendo comparable con los reportados en la literatura<sup>304</sup>. La absorbancia de los QD MPA/MES CdSe es mayor que la observada para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en el rango de 350 a 470 nm; este efecto permite que la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> presente una extendida absorción de luz en la región espectral del visible en comparación con la presentada para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, aumentando proporcionalmente con la cantidad puntos cuánticos en su superficie.

Para el caso de las heteroestructuras conjugadas 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, 50/50 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y 100/0 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, el  $E_g$  se encontró a 2,28 eV, 2,30 eV y 2,34 eV, respectivamente. Estos resultados permiten inferir que el valor de  $E_g$  de la heteroestructura conjugada es dependiente de los puntos cuánticos de CdSe. Cuando los puntos cuánticos CdSe se conjugan con las nanohojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, la presencia de defectos en la superficie del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> pueden inducir ligeros desplazamientos en los niveles de energía, actuando como barreras adicionales, disminuyendo la recombinación de los pares  $e^- - h^+$ . Esto se manifiesta como un  $E_g$  ligeramente mayor en el sistema conjugado<sup>305</sup>. Esta hipótesis puede comprobarse empíricamente mediante la comparación de los espectros de absorción entre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (Figura 65).

Como parte del análisis óptico y fotofísico de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se realizaron los decaimientos de fluorescencia para investigar la dinámica de transferencia de portadores de carga. Cada heteroestructura conjugada mostró dos tiempos de vida distintos, cuyos porcentajes relativos se calcularon ajustando los decaimientos de la intensidad de fluorescencia en el tiempo mediante el empleo de una ecuación biexponencial. Los tiempos de vida de la heteroestructura conjugada son similares a los de los puntos cuánticos MPA/MES CdSe no conjugados. Las ligeras diferencias observadas pueden atribuirse al cambio de entorno del QD y a su obtención. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Tiempos de vida de fluorescencia para g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

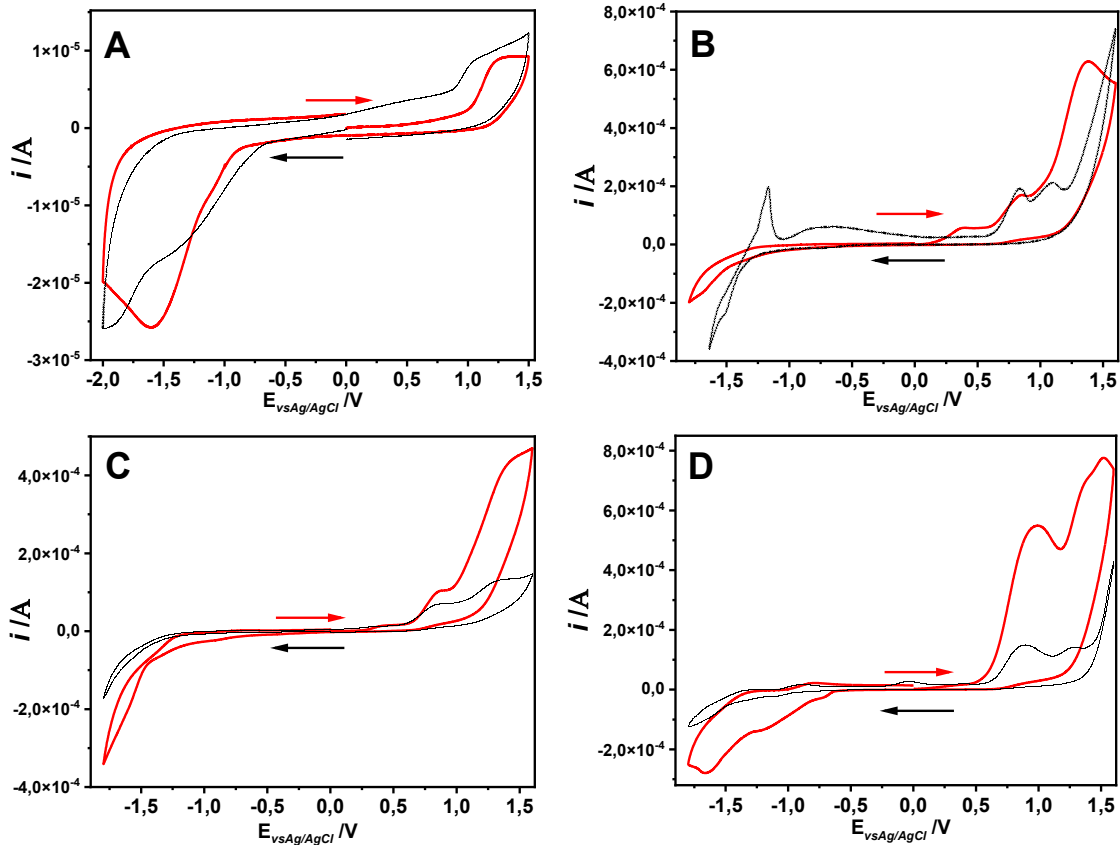
| Muestra                                            | Tiempo de vida /ns |             |          |             |
|----------------------------------------------------|--------------------|-------------|----------|-------------|
|                                                    | $\tau_1$           | $\beta_1$ % | $\tau_2$ | $\beta_2$ % |
| g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                    | 0,41               | 13          | 2,84     | 87          |
| 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 1,35               | 15          | 13,61    | 85          |
| 50/50 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 0,58               | 34          | 10,42    | 66          |
| 100/0 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 1,07               | 22          | 11,85    | 78          |

### 18.3. Caracterización electroquímica de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Se realizaron estudios electroquímicos del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para determinar los potenciales de reducción y oxidación, con el objetivo de identificar posibles mecanismos de transferencia de electrones y huecos entre las dos nanoestructuras. Por lo tanto, se realizaron voltamperogramas cíclicos en 1000  $\mu$ L de acetonitrilo conteniendo 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HTBA) como electrolito de soporte y 50  $\mu$ L de cada heteroestructura conjugada, bajo una atmósfera libre de oxígeno obtenida por burbujeo con argón, aplicando una velocidad de barrido de 50 mV/s. Los voltamperogramas se realizaron utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vítreo. Se realizaron barridos de potenciales tanto en dirección anódica, así como en dirección catódica, los cuales se muestran en la Figura 70.

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (Figura 70 (A)) mostró un E<sub>p,a</sub> de 1,22 V correspondiente a la inyección de huecos en la BV del nanomaterial. Cuando se realizó el barrido en la región catódica se encontró un E<sub>p,c</sub> de -1,31 V correspondiente a la inyección de electrones en la BC. Para ambos barridos, se pudo observar que los procesos de oxidación y reducción del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> son irreversibles. Para las heteroestructuras conjugadas con relaciones molares MPA/MES 30/70, 50/50 y 100/0 (Figura 70 (B), (C) y (D) respectivamente) los voltamogramas anódicos muestran dos picos correspondientes a los QD de CdSe y al g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, ya que estos picos aparecen cerca del E<sub>p,a</sub> de las nanoestructuras individuales. Para

todos los casos, las oxidaciones muestran una naturaleza irreversible. Al realizar el barrido catódico, se observó un único pico en el barrido directo, el que se corresponde tanto a la reducción del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> como de los QD de CdSe, en donde para este último la reducción es del Cd<sup>2+</sup> a Cd<sup>0</sup>. Cuando se invierte el barrido de potencial, se observa un pico de oxidación correspondiente a la oxidación de Cd<sup>0</sup>.



**Figura 70.** Voltamperogramas cíclicos para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (A), 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (B), 50/50 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (C) y 100/0 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (D) en una solución de ACN + HTBA 0,1 M, en dirección de barrido anódico (—) y catódico (—).  $\nu = 50$  mV/s.

A partir de la diferencia de los potenciales de pico anódico y catódico para cada una de las heteroestructuras analizadas, se pudo determinar el  $E_g$  electroquímico mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = E_g \quad (52)$$

Los valores de  $\Delta E_p$  calculados se muestran en la Tabla 10. Estos valores, fueron comparados con los resultados de  $E_g$  determinados para cada heteroestructura conjugada mediante el método óptico.

**Tabla 10.**  $E_g$  determinado por espectroscopía UV-visible y  $\Delta E_p$  determinado por voltamperometría cíclica para g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

| Muestra                                            | $E_{p,a}$ /V | $E_{p,c}$ /V | $\Delta E_p$ /V | $^a E_g$ /eV |
|----------------------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                    | 1,22         | -1,31        | 2,53            | 2,55         |
| 30/70 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 0,83         | -1,51        | 2,34            | 2,28         |
| 50/50 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 0,85         | -1,53        | 2,38            | 2,30         |
| 100/0 MPA/MES CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 0,89         | -1,56        | 2,45            | 2,34         |

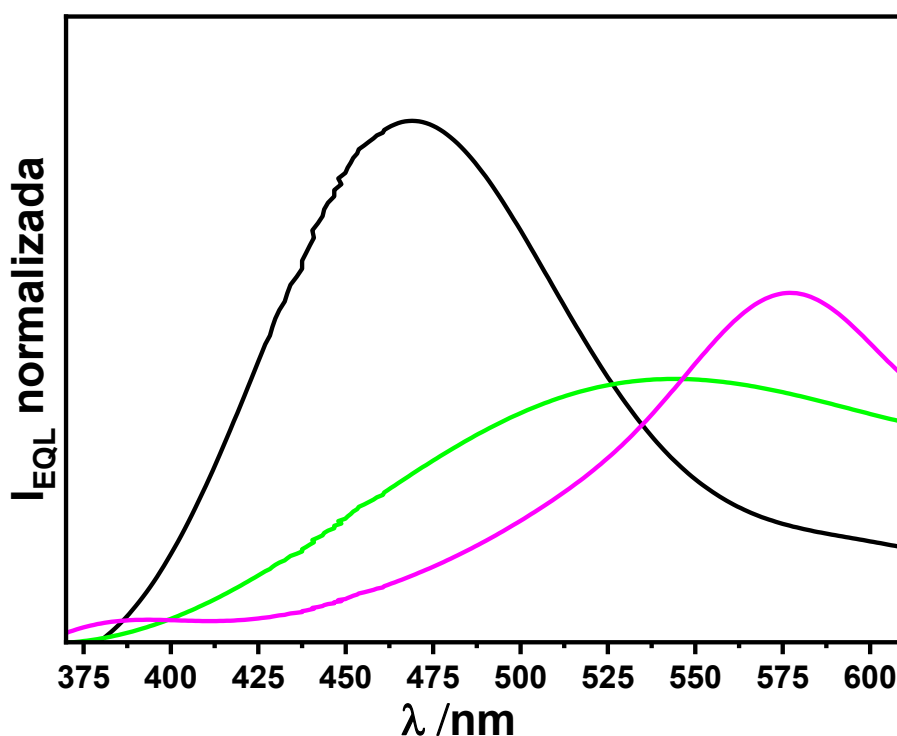
<sup>a</sup> $E_g$  determinada por espectroscopía UV-visible.

Para el caso del  $\Delta E_p$  correspondiente a las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se tomó en cuenta el primer  $E_{p,a}$  relacionado con la oxidación de los puntos cuánticos de CdSe presentes en la heteroestructura conjugada. La diferencia en cuanto a los valores de  $E_g$  calculados tanto para el método óptico, como para el método electroquímico, se justifica debido a que el  $E_g$  óptico es el resultado la interacción electrón - fotón y la formación de excitones, siendo este un proceso que ocurre en el núcleo de cada nanomaterial.

En cuanto al  $E_g$  electroquímico, es el resultado de la interacción electrón - electrodo y los efectos de solvatación con el medio de medición, siendo este un proceso superficial en cada nanoestructura<sup>306</sup>. Nuevamente, la presencia de los puntos cuánticos disminuye el valor de la diferencia de energía entre las bandas de valencia y de conducción.

#### 18.4. Análisis electroquimioluminiscente de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Para realizar mediciones de EQL, se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de las síntesis de heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, a una solución tampón de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 y 100  $\mu\text{L}$  de TPrA de concentración de 5,25 M. Para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los QD de CdSe, las mediciones de EQL se realizaron bajo las mismas condiciones, es decir, adicionando los mismos volúmenes de cada solución de nanomaterial y de TPrA. En una primera etapa, para cada solución, se determinó el espectro de EQL, a partir de la respuesta de  $i$  vs  $t$ , cuando se aplicó un potencial constante de 1,3 V (vs. Ag/AgCl), los que se muestran en la Figura 71.



**Figura 71.** Espectros de EQL normalizados para g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), QD MPA/MES CdSe (—), y las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), en tampón Tris – HCl, pH 7,4 y TPrA 0,1 M.  $E_{\text{aplicado}} = 1,3$  V.

Al comparar los máximos de emisión de EQL con los observados en la emisión de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se observó un corrimiento batocrómico del máximo de emisión EQL (468 nm) en comparación al máximo de fluorescencia registrado (414 nm), sugiriendo que los electrones están regresando a su estado fundamental desde un estado

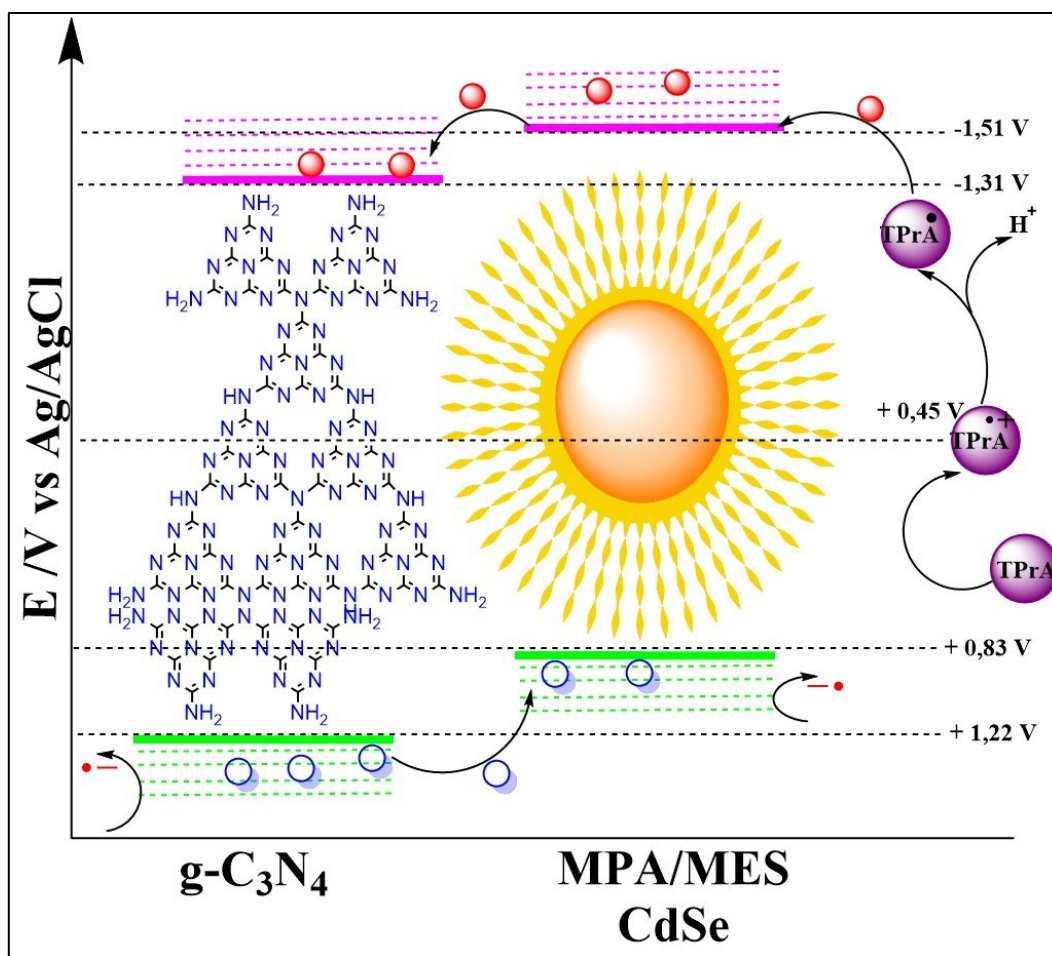
excitado de menor energía, fenómeno que ocurre en procesos de luminiscencia generada a partir de un proceso electroquímico<sup>307</sup>.

Para el caso del QD de CdSe, la emisión de fluorescencia se encontró a 598 nm, mientras que el espectro de EQL registró a 543 nm, mostrando un corrimiento hipsocromico producto de una recombinación  $h^+ - e^-$  desde un estado excitado de mayor energía, lo que resulta en la emisión de luz con una longitud de onda más corta comparada con lo registrado en la fluorescencia<sup>308</sup>. Para el caso de las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se observó una banda predominante con un máximo de emisión en 578 nm, valor de emisión cercano al máximo de emisión del QD CdSe sin conjugar, y una banda pequeña con un máximo cercano a 387 nm, cercana al máximo de emisión de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

A partir de este resultado, en la heteroestructura conjugada ocurre una transferencia de carga entre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y el QD de CdSe, resultando en un único pico dominante. La ausencia de una banda en el rango de emisión del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en el espectro de EQL de la heteroestructura conjugada, permite inferir que el QD CdSe actúa como especie emisora de la luz. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante los estudios de fluorescencia. El proceso de transferencia de cargas desde el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hacia los QD de CdSe en la heteroestructura conjugada, se explica por las diferencias en el  $E_{p,a}$  de cada nanoestructura, tal y como se describe en la Figura 72.

Cuando el potencial anódico aplicado al electrodo supera 1,22 V, tanto el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, los QD de CdSe y TPrA se oxidan. Sin embargo, debido a la diferencia de energía entre las bandas de ambos nanomateriales (0,39 V), se puede llevar a cabo una transferencia de huecos desde el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> al QD de CdSe, proceso que se ve favorecido termodinámicamente, en la medida que exista una distancia lo suficientemente cercana entre ambos nanomateriales<sup>309,310</sup>.

Por otra parte, la especie química proveniente de la oxidación de TPrA ( $E_{p,a} = 0,45$  V) inyecta electrones en la BC de ambas nanoestructuras. Así, la inyección de huecos a la BV de QD CdSe por parte del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, incrementa la formación de pares  $h^+ - e^-$  en el QD, y la desfavorece en el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. A partir de este análisis, el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> es el dador de cargas en el proceso de transferencia electrónica, y el QD CdSe conjugado en la nanolamina, el aceptor y responsable de la transición radiativa.

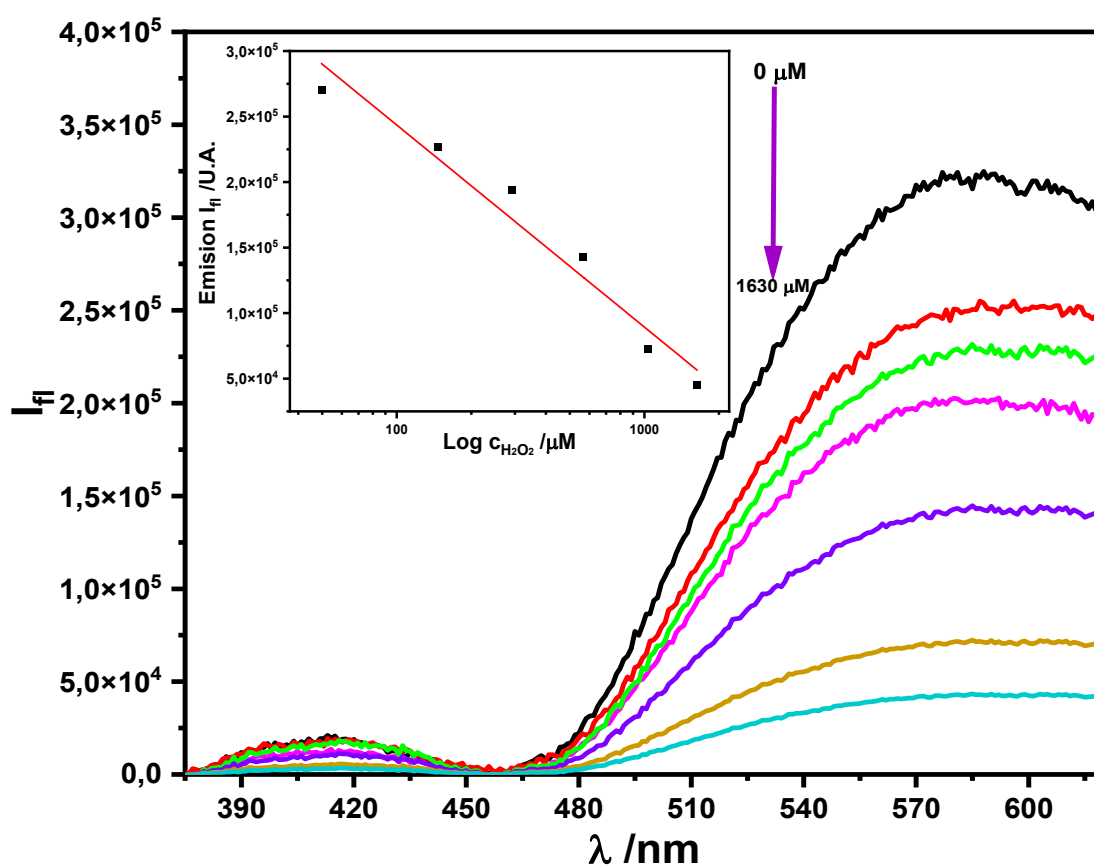


**Figura 72.** Diagrama de los niveles energéticos de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Descripción de la posible transferencia electrónica en presencia de TPrA como mecanismo de electroquimioluminiscencia. Las líneas verdes corresponden a la BV (—), las líneas magenta a la BC (—), ● corresponde al electrón y ○ los huecos.

De acuerdo con los niveles de energía de ambas nanoestructuras y teniendo en cuenta defectos de superficie y estados trampas, la heteroestructura conjugada se puede considerar como una hetero unión de tipo II<sup>311,312</sup>. Los resultados confirman, además, que la heteroestructura del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con los QD de CdSe de tipo II, es eficiente en cuanto separación y transferencia de carga a través de la interfaz de ambas nanoestructuras.

### 18.5. Efecto del $\text{H}_2\text{O}_2$ en la intensidad de fluorescencia y electroquimioluminiscencia de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Como parte de los estudios realizados, se analizó la desactivación de los procesos radiativos ante la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Se realizaron mediciones de fluorescencia y EQL a diferentes agregados de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se observó la respuesta en ambos procesos. Para de emisión de fluorescencia, a partir de una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1 \times 10^{-2}$  M, se agregaron volúmenes de 10, 20, 30, 60, 110 y 160  $\mu\text{L}$  a una solución de 2000  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl, pH 7,4 junto con 25  $\mu\text{L}$  de la heteroestructura conjugada y 100  $\mu\text{L}$  de TPrA 5,25 M. Se midieron los espectros de fluorescencia en el rango de emisión desde 350 nm a 610 nm excitando a una longitud de onda de 320 nm, los que se muestran en la Figura 73.



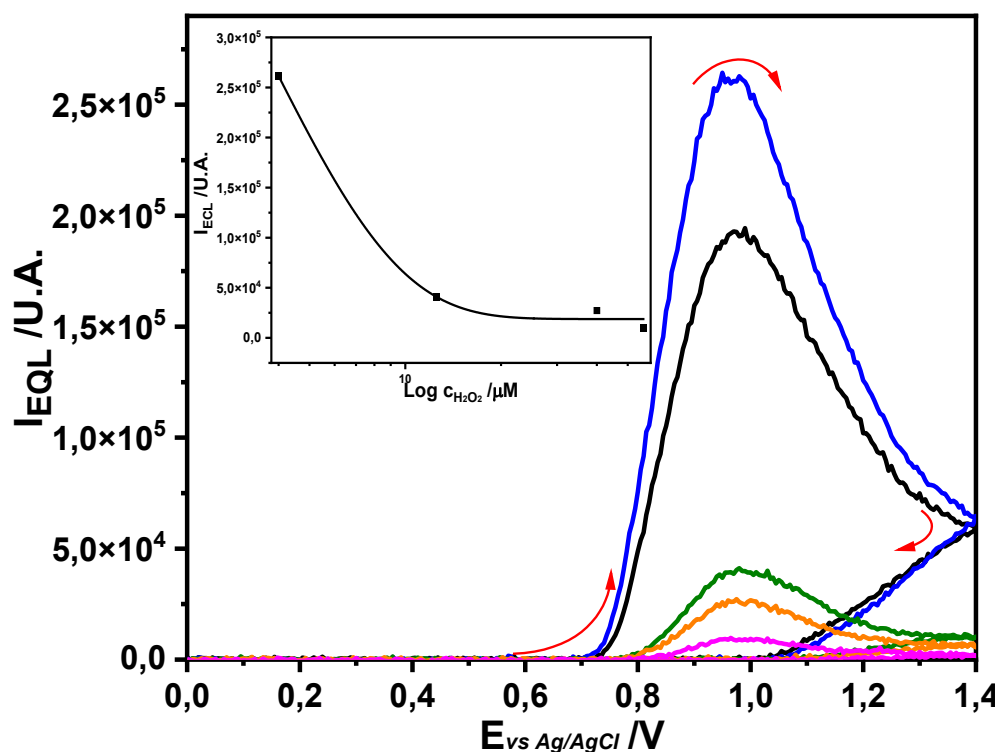
**Figura 73.** Espectros de intensidad de fluorescencia de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en presencia de (—) 0  $\mu\text{M}$ , (—) 49,7  $\mu\text{M}$ , (—) 147  $\mu\text{M}$ , (—) 291  $\mu\text{M}$ , (—) 566  $\mu\text{M}$ , (—) 1030  $\mu\text{M}$  y (—) 1630  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inserto: grafica  $I_{\text{FL}}$  vs  $\text{Log } c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 320$  nm.

En la región de emisión del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (370 nm – 450 nm) se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia con relación al aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Análogamente, la banda correspondiente a la región de emisión del QD de CdSe disminuyó proporcional al aumento del volumen agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sistema. El aumento del volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puede generar la aparición y presencia de especies responsables de oxidar la heteroestructura. Particularmente, cuando se oxida la superficie de los puntos cuánticos, se pueden separar de la superficie los ligandos estabilizantes MPA/MES, formando nuevos estados trampa no radiativos<sup>313</sup>.

Estos defectos pueden actuar como sumideros de energía, atrapando electrones o huecos. Cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 49,7 µM la intensidad de fluorescencia disminuyó un 22,1 % con respecto a la emisión de la heteroestructura en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La respuesta fluorescente a una concentración de 1630 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decayó 86,2% con respecto a la emisión inicial de la heteroestructura conjugada. Es válido afirmar a partir de estos resultados, que la heteroestructura conjugada es sensible a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sistema.

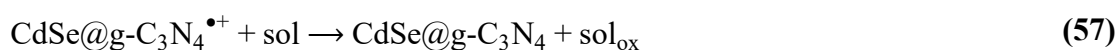
Una vez analizada la respuesta fluorescente de la heteroestructura conjugada en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se realizaron las pruebas para determinar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la luminiscencia electrogenerada. La Figura 74 muestra los voltamperogramas de EQL de una solución de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a distintos volúmenes agregados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

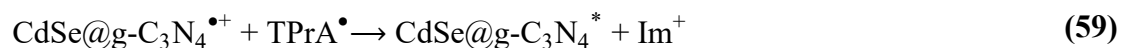
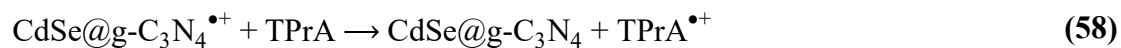
En ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (línea negra), en el barrido anódico se observa un incremento de la señal a partir de 0,75 V, alcanzando su máximo de emisión a un potencial de 0,97 V. Este comportamiento concuerda con la oxidación electroquímica tanto de los puntos cuánticos de CdSe como de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> dentro de la heteroestructura. Cuando se añadió una baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4×10<sup>-6</sup> M, línea azul), se observó un aumento de la intensidad. Sin embargo, cuando se añaden mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la intensidad de EQL disminuye significativamente. A bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se producen oxidaciones sobre los nanomateriales que facilitan la emisión de luz, sin embargo, cuando la concentración aumenta, hay una elevada concentración de especies reactivas de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH•) que, como se mencionó previamente, contribuyen a la degradación de la heteroestructura con la consecuente disminución de los procesos de emisión.



**Figura 74.** Voltamperogramas de EQL de una solución de 60  $\mu\text{L}$  de MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—) y para concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de: (—) 4  $\mu\text{M}$ , (—) 12,5  $\mu\text{M}$ , (—) 40  $\mu\text{M}$  y (—) 56  $\mu\text{M}$ . Inserto: grafica  $I_{\text{EQL}}$  vs  $\text{Log } c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ .  $v = 50 \text{ mV/s}$ .

De acuerdo con los anteriores resultados, y teniendo en cuenta los efectos del peróxido de hidrogeno sobre la EQL de la heteroestructura conjugada bajo estudio, se puede plantear el mecanismo de generación de la EQL. Las mediciones de EQL se realizaron en solución tampón Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 M, en donde se encuentran presentes la especie Tris, que posee un valor de constante de disociación básica de  $8,7 \times 10^5$ , y su ácido conjugado  $\text{Tris}[\text{NH}_3^+]$ <sup>314</sup>. A este valor de pH, las concentraciones de cada una de las especies son de 0,078 M y 0,022 M, respectivamente. Bajo estas condiciones y a partir de los datos bibliográficos el probable mecanismo para el sistema en estudio es<sup>316, 315</sup>



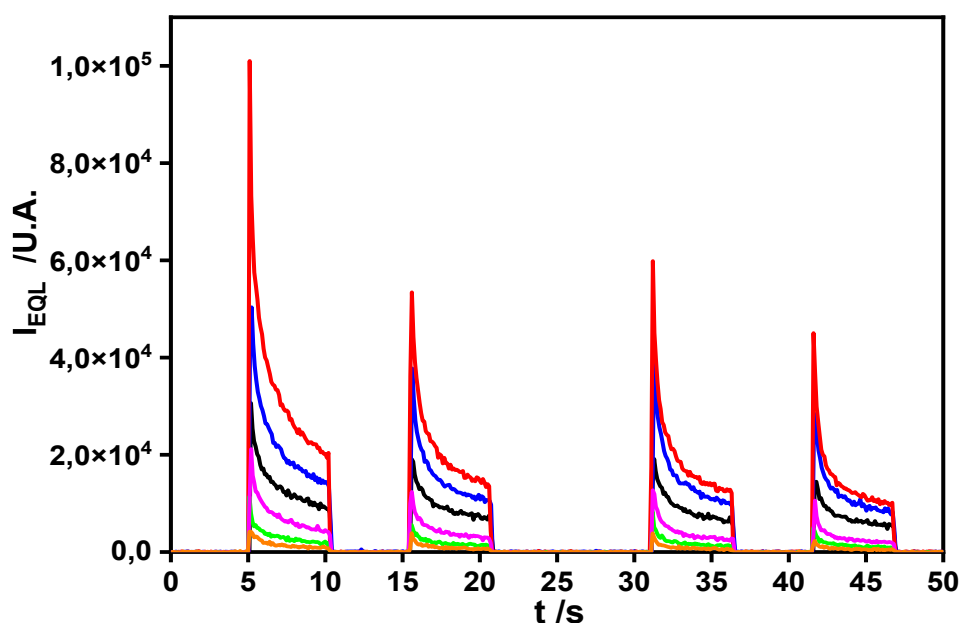


Las ecuaciones (53), (54) y (55) representan la reacción de la TPrA con Tris, en donde se produce la protonación de la TPrA por parte del Tris $[\text{NH}_3^+]$  (ecuación (53))<sup>316</sup>. TPrA se oxida en la superficie del electrodo, formando el radical catiónico  $\text{TPrA}^{\bullet+}$ , el cual difunde al seno de la solución (ecuación (54)), pero debido a su poca estabilidad frente a Tris, esta especie tiene un tiempo de vida demasiado corto, razón por lo que su concentración es casi despreciable. Para que la ecuación (55) ocurra, es necesario que la especie Tris se encuentre en alta concentración, dando lugar a la formación de la especie radical  $\text{TPrA}^{\bullet}$ <sup>317</sup>. La ecuación (56), hace referencia a la oxidación del conjugado cuando pierde  $n$  electrones los cuales son transferidos a la superficie del electrodo, formando huecos en la BV. Dentro de las posibles reacciones que pueden ocurrir en el seno de la solución, están las reacciones redox entre el conjugado oxidado y especies presentes en solución, las cuales compiten con la vía de EQL (ecuación (57)). Por otro lado, también puede ocurrir la reacción entre la heteroestructura oxidada y la TPrA en lejanías a la superficie electródica, formando una especie oxidada del coreactante (ecuación (58))<sup>315</sup>. Estas reacciones se pueden considerar como mecanismos de transiciones no radiativas que ocurren en solución, debido a que impiden la formación del conjugado en su estado excitado<sup>318</sup>. Las reacciones representadas en las ecuaciones (59) y (60) hacen referencian al mecanismo de EQL deseado, el cual es dependiente del encuentro de la especie oxidada  $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4^{\bullet+}$  y el radical  $\text{TPrA}^{\bullet}$  (radical altamente reductor) capaz de inyectar electrones en la banda de conducción del conjugado formando una especie excitada con la suficiente energía para emitir luz<sup>318</sup>. La especie  $\text{Im}^+$  (imidazol) es el producto resultante de la oxidación del radical neutro  $\text{TPrA}^{\bullet}$ . La eficiencia y rendimiento del proceso de EQL para este sistema depende de la estabilidad y de la interacción entre  $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4^{\bullet+}$  y  $\text{TPrA}^{\bullet}$ . La ecuación (61) corresponde a la posible reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con TPrA (en mayor proporción) y con la heteroestructura conjugada.

### 18.6. Rendimiento analítico electroquimioluminiscente de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Los resultados de los cambios en la EQL de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> promovió el uso de esta como una sonda para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó el estudio analítico del rendimiento y sensibilidad de la heteroestructura conjugada ante agregados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintas concentraciones en una solución compuesta por 60 µL de heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y 100 µL de TPrA 5,25 M en una solución de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 (volumen final de 2500 µL). Las mediciones de EQL se realizaron aplicando cronoamperometría de salto múltiple de potencial, en donde se realizaron cuatro ciclos de pulsos de potencial entre -0,2 V y 1,2 V, con tiempo de pulso de 5 segundos, mediante la técnica metodológica de detección electroquimioluminiscente on-off<sup>319</sup>.

La Figura 75 muestra los transitorios de EQL donde la intensidad disminuyó con el aumento de las cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agregadas. Además, se observó una alta reproducibilidad de las respuestas de para todas las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

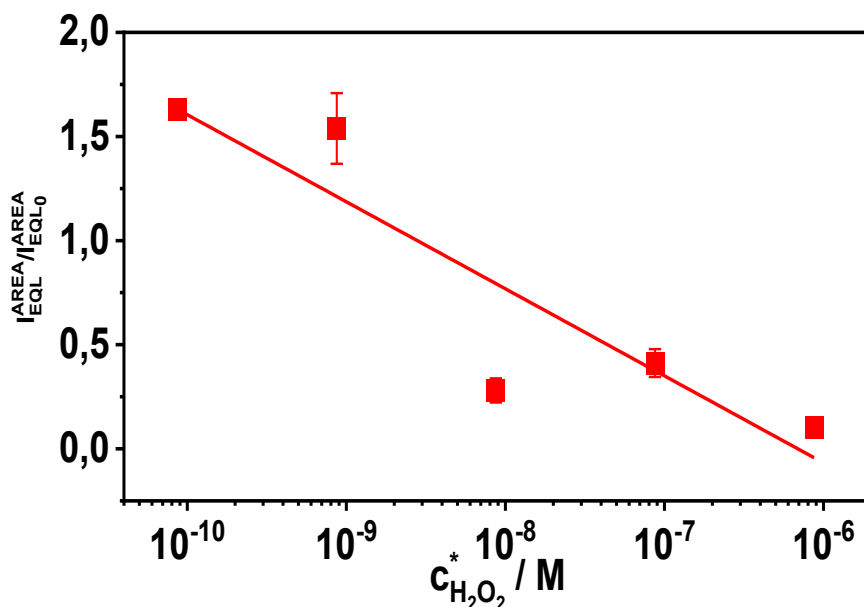


**Figura 75.** Respuesta de EQL en solución Tris-HCl y 25 mM TPrA para (—) MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: (—)  $8,71 \times 10^{-10}$  M, (—)  $8,71 \times 10^{-9}$  M, (—)  $8,71 \times 10^{-8}$  M, (—)  $8,71 \times 10^{-7}$  M y (—)  $8,71 \times 10^{-6}$  M.

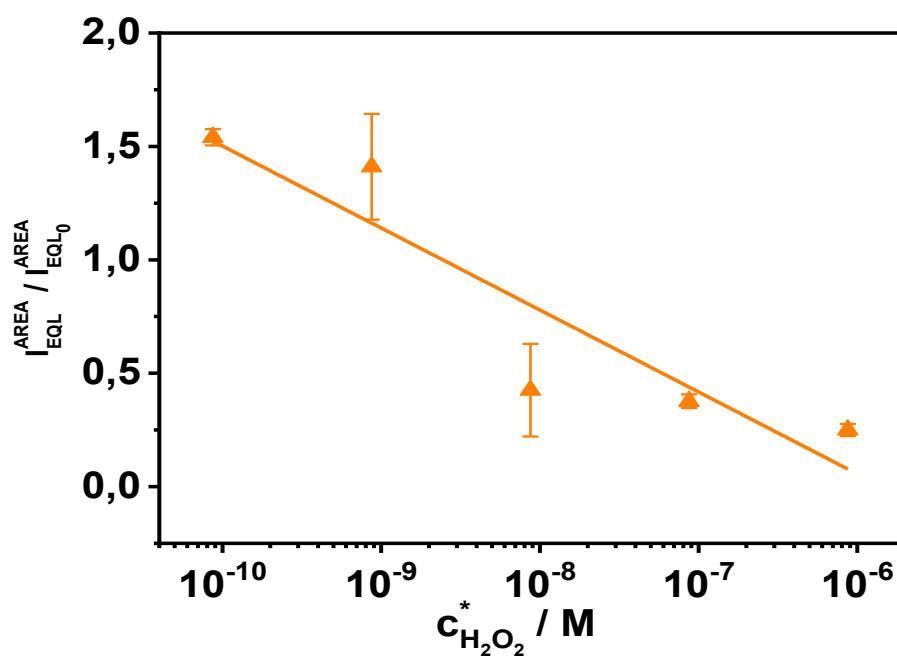
Para cada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  los valores de intensidad de EQL ( $I_{\text{EQL}}^{\text{area}}$ ) se determinaron calculando el área bajo cada transitorio de emisión utilizando la siguiente ecuación:

$$I_{\text{EQL}}^{\text{area}} = \int_{t_n}^{t_n+5\text{ s}} I_{\text{EQL}} dt \quad (62)$$

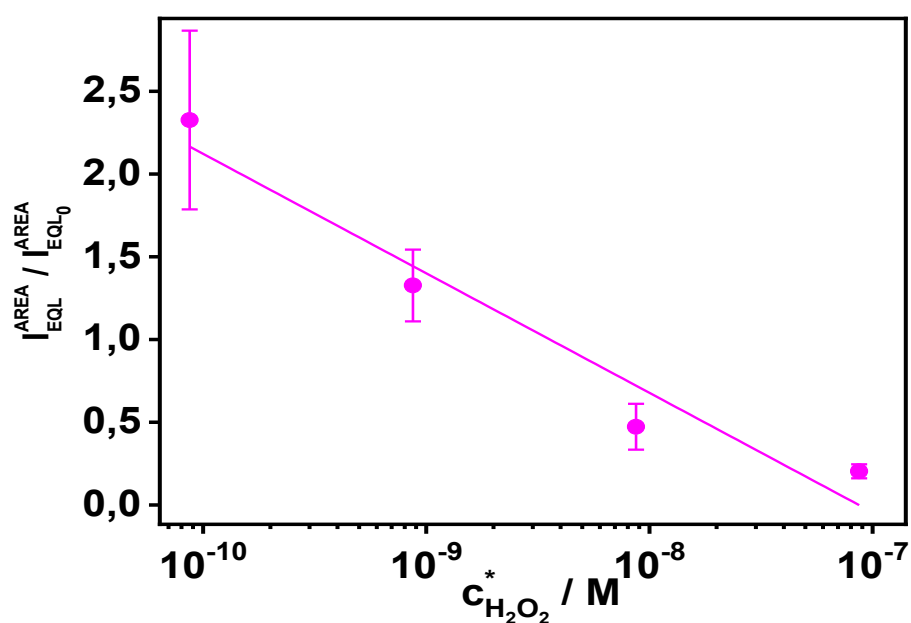
donde  $t_n$  corresponde al tiempo de inicio de cada salto de potencial y EQL es el valor de la intensidad de EQL para cada tiempo. Se construyó una curva de calibración para cada heteroestructura conjugada  $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4$  con relaciones molares MPA/MES de 30/70, 50/50 y 100/0, tal y como se muestra en la Figura 76, Figura 77 y Figura 78 respectivamente. Cada curva fue representada como  $I_{\text{EQL}}^{\text{area}}/I_{\text{EQL}}^{\text{area}^0}$  vs.  $\text{Log } c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*$ , donde  $I_{\text{EQL}}^{\text{area}^0}$  corresponde al valor obtenido en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 76.** Curvas de calibración para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de las heteroestructuras conjugada 30/70 MPA/MES  $\text{CdSe@g-C}_3\text{N}_4$ . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas.



**Figura 77.** Curvas de calibración para la determinación de  $H_2O_2$  de las heteroestructuras conjugada 50/50 MPA/MES CdSe@g- $C_3N_4$ . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas.



**Figura 78.** Curvas de calibración para la determinación de  $H_2O_2$  de las heteroestructuras conjugada 100/0 MPA/MES CdSe@g- $C_3N_4$ . Cada punto es el promedio de 10 mediciones replicadas.

A partir de las curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó el análisis de las cifras de mérito para cada heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Cifras de mérito obtenidas para las heteroestructuras conjugadas MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución Tris-HCl.

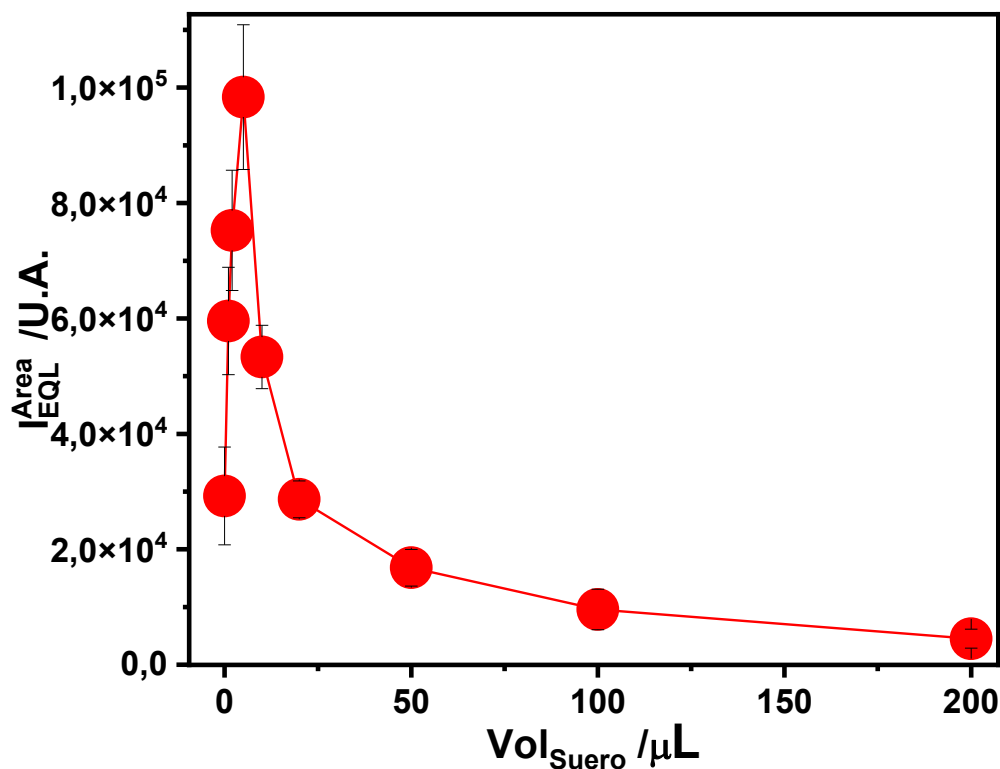
| MPA/MES<br>CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | LD /M                            | LC /M                            | Sensibilidad<br>/ M <sup>-1</sup> |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>30/70</b>                                    | $1,81 \times 10^{-9}$ (0,06 ppb) | $5,37 \times 10^{-9}$ (0,18 ppb) | $1,52 \times 10^8$                |
| <b>50/50</b>                                    | $3,75 \times 10^{-9}$ (0,13 ppb) | $1,03 \times 10^{-8}$ (0,35 ppb) | $1,19 \times 10^8$                |
| <b>100/0</b>                                    | $2,07 \times 10^{-8}$ (0,70 ppb) | $6,21 \times 10^{-8}$ (2,11 ppb) | $1,87 \times 10^8$                |

La relación molar 100/0 MPA/MES en la heteroestructura conjugada, genera una sensibilidad ligeramente superior, pero presenta un límite de detección un orden de magnitud superior en comparación a la heteroestructura conjugada con relación molar 30/70 MPA/MES. La heteroestructura conjugada sintetizada con una relación molar MPA/MES 30/70 arrojó el límite de detección más bajo ( $1,81 \times 10^{-9}$  M), lo que indica que dicha heteroestructura conjugada tiene mayor capacidad para detectar concentraciones más pequeñas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A medida que disminuye la proporción de MPA respecto a MES en el capping del QD de CdSe, se observa una reducción del límite de detección, siendo más eficiente para detectar trazas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sistemas acuosos.

### 18.7. Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en muestras de suero

En función de los bajos límites de detección obtenidos en los ensayos en sistemas acuosos de Tris-HCl, y como método de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en matrices complejas biológicas, se decidió comprobar la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en suero humano liofilizado reconstituido, como una prueba de concepto de esta sonda electroquioluminiscente. El suero liofilizado reconstituido es una matriz compleja que imita al suero humano, con niveles conocidos

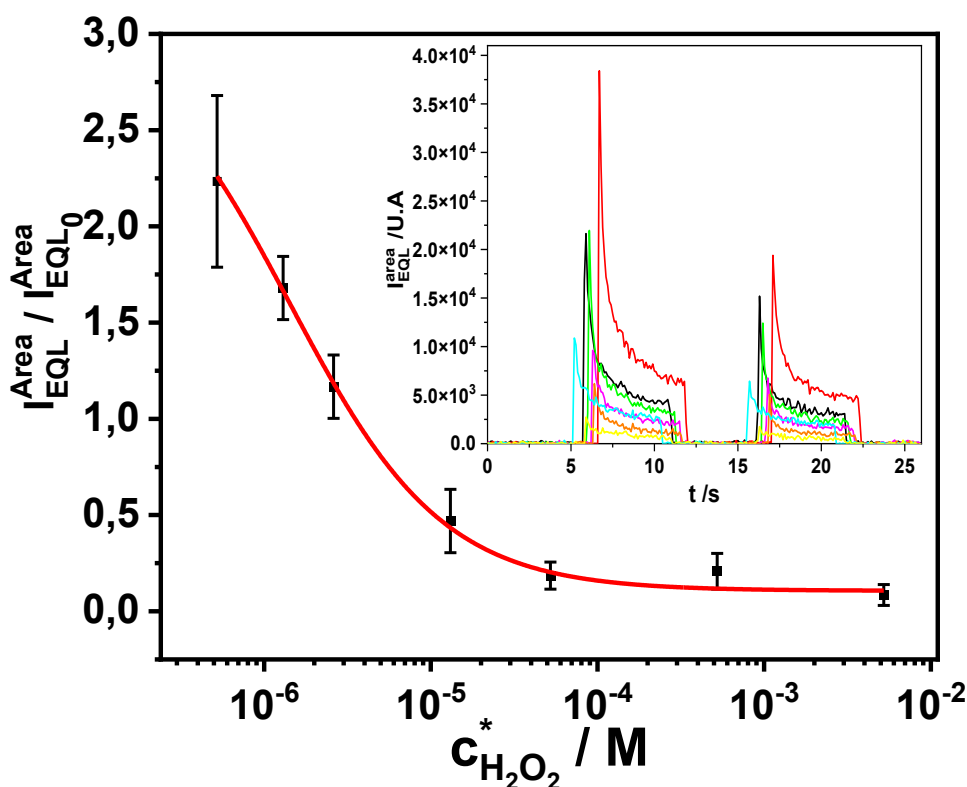
de analitos específicos como electrolitos, enzimas, metabolitos y proteínas; razón por la que utilizó como matriz para cuantificar. Se estudió la respuesta de EQL de la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> considerando los resultados en sistemas acuosos, para distintos agregados de suero liofilizado con concentración 4,5 UA/dL (Figura 79).



**Figura 79.** Intensidad de EQL para la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en presencia de diferentes volúmenes agregados de suero liofilizado reconstituido en una solución Tris-HCl pH 7,4, + TPrA 0,21 M.

Se registró un máximo de intensidad de EQL cuando el volumen de agregado del suero fue de 5  $\mu\text{L}$ . Para un aumento del volumen agregado de suero liofilizado la intensidad de EQL disminuyó debido a un claro efecto de matriz, originada en una desactivación no radiativa de las especies de mayor energía. A partir de estos resultados, se tomó como valor de referencia el agregado de 5  $\mu\text{L}$  de suero liofilizado reconstituido para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras. Por lo tanto, se prepararon soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones en suero liofilizado reconstituido. 5  $\mu\text{L}$  de cada solución fue agregada a la solución Tris-HCl, manteniendo las concentraciones de TPrA y MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

Los transitorios de EQL y la curva de calibración para la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> mantienen el comportamiento observado en la solución tampón (Figura 80). Cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de  $5,2 \times 10^{-7}$  M, la intensidad de EQL aumentó 39,5 %. Luego, la disminución de la intensidad de EQL fue proporcional al aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se mencionó anteriormente. El comportamiento exponencial de la curva de calibración de la Figura 80 indica una saturación para concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superiores a  $5 \times 10^{-6}$  M. Se obtuvo una relación lineal desde  $5,2 \times 10^{-7}$  a  $5,2 \times 10^{-6}$  M.



**Figura 80.** Curva de calibración de EQL para la heteroestructura conjugada 30/70 MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en presencia de 5  $\mu$ L de suero liofilizado a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inserto: transitorios de electroquimioluminiscencia para agregados de 5  $\mu$ L de suero liofilizado con concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de (—)  $5,20 \times 10^{-7}$  M, (—)  $1,30 \times 10^{-6}$  M, (—)  $2,60 \times 10^{-6}$  M, (—)  $5,20 \times 10^{-5}$  M, (—)  $5,20 \times 10^{-4}$  M, (—)  $5,20 \times 10^{-3}$  M, y (—)  $5,20 \times 10^{-2}$  M en solución tampón Tris – HCl + 25 mM TPrA, siendo  $E_{\text{off}} = -0,2$  V y  $E_{\text{on}} = 1,3$  V. Cada punto representa el promedio de 10 medidas replicadas.

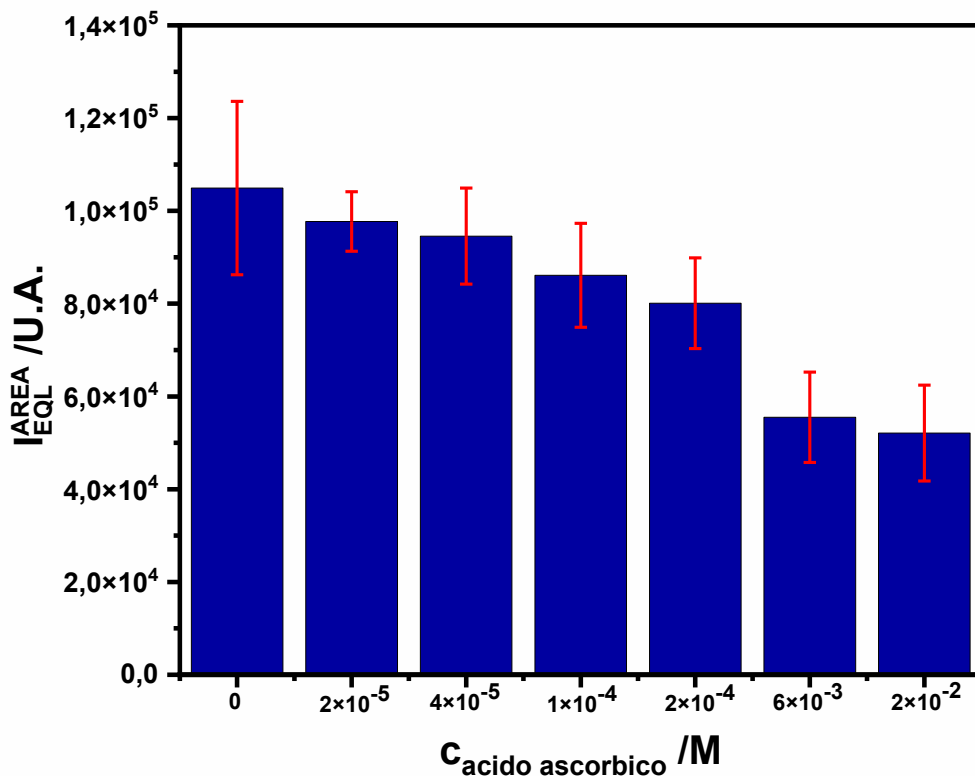
Debido al efecto de matriz de la muestra de suero, la intensidad de EQL decae aproximadamente 4 veces comparado a las medidas en tampón Tris-HCl. Sin embargo, es importante destacar la buena reproducibilidad del sistema en estudio. Los valores de coeficiente de variación (CV o también denominada RSD, por sus siglas en inglés de desviación estándar relativa porcentual) obtenidos para concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $5,20 \times 10^{-7}$  M,  $1,30 \times 10^{-6}$  M y  $2,60 \times 10^{-6}$  fueron de 11, 17 y 13 %. Estos resultados son muy buenos considerando que la muestra de suero liofilizado reconstituido no tuvo ningún pretratamiento.

#### **18.8. Selectividad y repetibilidad de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en la detección de $\text{H}_2\text{O}_2$**

Para examinar la especificidad de la heteroestructura conjugada hacia la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en muestras de suero liofilizado se realizaron estudios analíticos de selectividad. El suero liofilizado Standatrol S-E 2 niveles (Wiener Lab®) tiene iones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$ . También posee glucosa, urea, ácido úrico y colesterol, entre otros, a niveles de concentración de  $4,48 \times 10^{-3}$  M,  $6,33 \times 10^{-3}$  M,  $2,91 \times 10^{-4}$  M y  $6,44 \times 10^{-3}$  M, respectivamente (véase los datos de referencia de Standatrol S-E 2). Los anteriores niveles de concentración están cerca de tres órdenes por encima del  $\text{H}_2\text{O}_2$  determinado. Para mitigar estas interferencias, las muestras de suero se diluyeron 415 veces antes de la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, el ácido ascórbico, una molécula hidrosoluble esencial que actúa como antioxidante primario en el suero humano, donde participa en la neutralización de especies reactivas de oxígeno, la regeneración de otros antioxidantes y el mantenimiento del equilibrio redox asociada con estrés oxidativo, procesos inflamatorios, disfunción inmunológica y diversas patologías metabólicas, no está presente en el suero liofilizado. Por consiguiente, se realizó un estudio de interferencia para el ácido ascórbico, como se muestra en la Figura 81.

El ácido ascórbico (AA) muestra una interferencia mínima con la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M, tres veces superior a los niveles fisiológicos del suero. Por consiguiente, la interferencia del AA es insignificante en condiciones fisiológicas normales para este sistema sensor. Los resultados indicaron que la selectividad de la sonda hacia la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es aceptable. El ácido ascórbico se oxida a bajo

potencial sobre el electrodo, los que pueden formar cationes radicales intermedios que pueden reaccionar con la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> o con TPrA, afectando la emisión de EQL<sup>320,321</sup>.



**Figura 81.** Intensidad de EQL medida en suero liofilizado reconstituido con  $1 \times 10^{-6}$  M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diferentes agregados de ácido ascórbico. La barra de error representa el promedio de tres medidas replicadas.

Con respecto a la repetibilidad de la señal de la heteroestructura conjugada ante la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizaron mediciones en la matriz de suero liofilizado a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se tomaron triplicados de las respuestas bajo la presencia del analito estudiado. Como parámetro de cuantificación de la repetibilidad de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se determinó la desviación estándar relativa porcentual (RSD por sus siglas en ingles) de cada concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de los valores de intensidad de EQL registrados. El valor de RSD se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$RSD_{\%} = \frac{\sigma_{\text{estandar}}}{\overline{I_{\text{EQL}}^{\text{Area}}}} \times 100 \quad (63)$$

Siendo entonces  $\sigma_{\text{estandar}}$  la desviación estándar del promedio de las intensidades de EQL para cada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los datos se muestran en la Tabla 12. Los valores de desviación estándar relativa (RSD %) obtenidos para cada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron del orden del 5 %, lo cual se considera como un excelente valor en términos de repetibilidad analítica para muestras complejas no tratadas. Estos resultados confirman la estabilidad de la sonda en la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reproducibilidad de la respuesta de EQL de la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> fue evaluada mediante ensayos de detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleando cinco lotes independientes de síntesis de heteroestructura conjugada. Para cada heteroestructura, se realizaron mediciones por quintuplicado a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados arrojaron una desviación estándar relativa (RSD%) promedio del 4,88 %, lo cual evidencia una alta reproducibilidad del proceso de síntesis, manteniendo inalteradas las propiedades del sistema frente a la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos hallazgos confirman la estabilidad y confiabilidad de la sonda desarrollada para aplicaciones analíticas en sistemas complejos como la matriz de suero liofilizado reconstituido.

**Tabla 12.** Desviación estándar relativa promedio (RSD %) obtenida a partir del promedio de la intensidad de EQL para distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizando una matriz compuesta por 5  $\mu\text{L}$  de suero liofilizado reconstituido diluido en 2500  $\mu\text{L}$  de solución tampón Tris-HCl.

| $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^{\text{suero}} / \text{M}$ | $\overline{I_{\text{EQL}}^{\text{Area}}}$ | $\sigma_{\text{estandar}}$ | RSD /% |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|--------|
| 0                                                    | 621177,34                                 | 22546,9                    | 4,32   |
| $5,2 \times 10^{-7}$                                 | 1711590,39                                | 87321,39                   | 5,1    |
| $5,2 \times 10^{-6}$                                 | 268319,1                                  | 6508,18                    | 2,42   |
| $5,2 \times 10^{-5}$                                 | 94907,03                                  | 3302,23                    | 3,47   |
| $5,2 \times 10^{-4}$                                 | 61870,68                                  | 1215,66                    | 1,96   |
| $5,2 \times 10^{-3}$                                 | 26892,25                                  | 1333,87                    | 4,96   |
| $5,2 \times 10^{-2}$                                 | 13650,08                                  | 640,34                     | 4,69   |

El promedio EQL se determinó mediante n=3 repeticiones

### 18.9. Comparación del rendimiento de la sonda electroquimioluminiscente con otros sensores para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El rendimiento de la sonda electroquimioluminiscente se comparó con el de otros sensores relevantes para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se muestra en la Tabla 13.

La sonda demostró ventajas como alta sensibilidad, amplio rango lineal y límites de detección muy bajos para detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución tampón Tris-HCl. Además, su capacidad para operar en matrices complejas, como el suero liofilizado, sin interferencias significativas, destaca su potencial para aplicaciones prácticas.

**Tabla 13.** Diferentes métodos propuestos en la literatura para cuantificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

| Material/sonda                           | Técnica                               | Muestra             | Rango lineal / $\mu$ M | LOD / $\mu$ M         | Ref.        |
|------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------|
| Fibras de PdNP/CNT                       | Amperometría                          | PBS pH 7,4          | 0,002-1,3              | 2                     | 322         |
| Pd-NPs/BGFs/GCE                          | Amperometría                          | PBS pH 7,4          | 4-13500                | 1,5                   | 323         |
| DHLA-CuNCs                               | Métodos de detección de fluorescencia | Solución acuosa     | 1-10                   | 0,3                   | 324         |
| AuNPs-AuNCs                              |                                       | PBS pH 8            | 1-100                  | 0,8                   | 325         |
| CuNCs/ZIF-8                              |                                       | Tampón acetato pH 7 | 0,5-30                 | 0,5                   | 326         |
| NPs de conversión ascendente             |                                       | PBS pH 6,5          | 2,5-70                 | 0,8                   | 327         |
| CdTe                                     |                                       | PBS pH 7            | 10-125                 | 0,3                   | 328         |
| CdSe@ZnS/AgNCs                           |                                       | Tris-HCl            | 0,5 60                 | 0,3                   | 329         |
| CuO/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /GCE | DPV                                   | PBS pH 7            | 0,5-50                 | 0,31                  | 330         |
| HRP/AuNPs/CESM                           | Amperometría                          | PBS pH 7            | 10-2700                | 3                     | 331         |
| CdSe@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>     | Electroquimioluminiscencia            | Tris-HCl pH 7,4     | $1 \times 10^{-4}$ - 1 | $1,81 \times 10^{-3}$ | Este sensor |

GCE: electrodo de carbono vitreo; NPs: nanopartículas; NCs: nanocristales Pd: polímeros dots;

CNT: nanotubos de carbono.

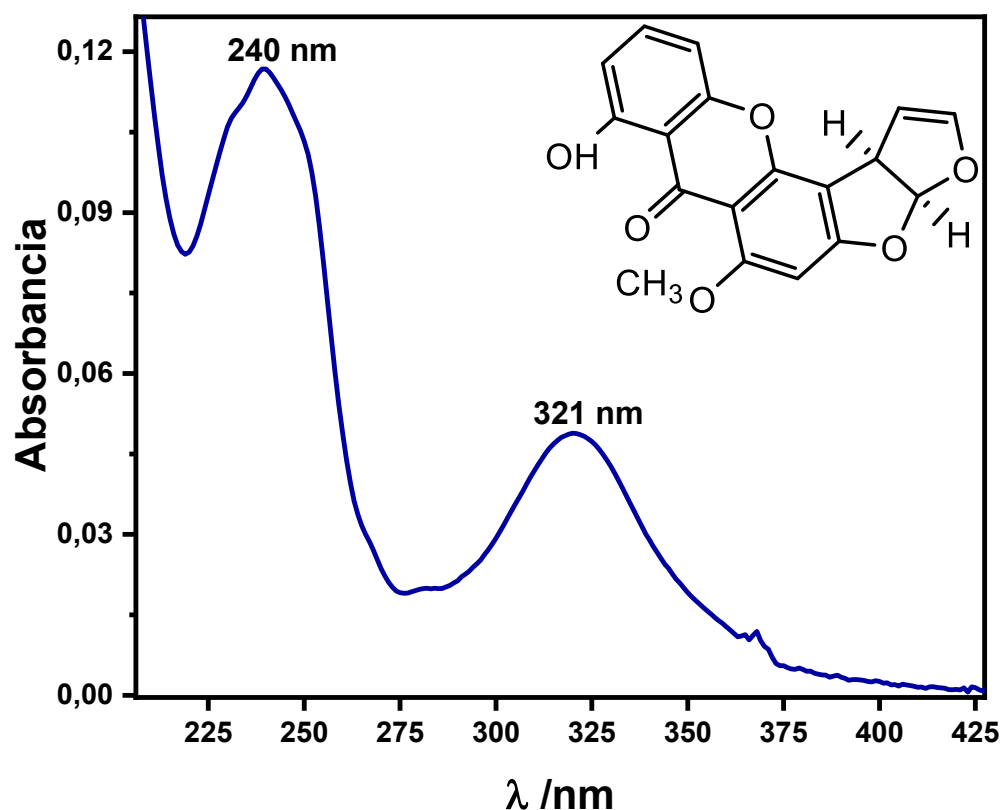
## 19. Desarrollo de un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de STE

El inmunosensor desarrollado para la detección de la micotoxina STE utilizó como técnica de detección la EQL. A partir de los estudios realizados, sabiendo que en cercanías entre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los QDs de CdSe se produce un efecto de transferencia de cargas, en donde los QDs actúan como emisores electroquimioluminiscentes, el inmunosensor se basó en la modificación de la superficie conductora de un electrodo de ITO con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliado, sobre el cual se inmovilizaron mAb-STE capaces de reconocer STE y un bioconjugado formado por STE enlazado a los QD de CdSe. El diseño del inmunosensor electroquimioluminiscente involucró etapas de optimización y caracterización para garantizar una mayor sensibilidad en la detección de la micotoxina de interés. Considerando los estudios de análisis y caracterización de los nanomateriales sintetizados, así como la técnica de detección empleada, se realizaron análisis fisicoquímicos de la micotoxina STE, caracterización de la superficie del inmunosensor y evaluación de las condiciones óptimas para su ensamblaje.

### 19.1. Caracterización UV-Vis de la esterigmatocistina

De acuerdo con el espectro de absorción de la Figura 82, STE presenta dos bandas de absorción con máximos a 240 y 321 nm<sup>332</sup>. El máximo de absorbancia a 240 nm se relaciona principalmente con las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los enlaces dobles en los anillos aromáticos de la estructura de xantona, y el máximo a 321 nm se atribuye a las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ , influenciada por los grupos funcionales como el hidroxilo (-OH) y el metoxi (-OCH<sub>3</sub>), que pueden modificar la densidad electrónica del sistema conjugado, afectando así las energías de transición<sup>333,334</sup>.

De acuerdo con los valores de absorbancia obtenidos y a partir de los coeficientes de extinción molar reportados en la literatura para la STE en solución ACN, con valores de  $\epsilon_{240\text{ nm}}=37200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{321\text{ nm}}=16200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , se cuantificaron las concentraciones de las soluciones de STE utilizadas para la síntesis de bioconjugación y detección en el inmunosensor<sup>333</sup>.



**Figura 82.** Espectro de absorción de la STE en ACN. Inserto: estructura química de la STE.

## 19.2. Caracterización del bioconjugado CdSe@STE

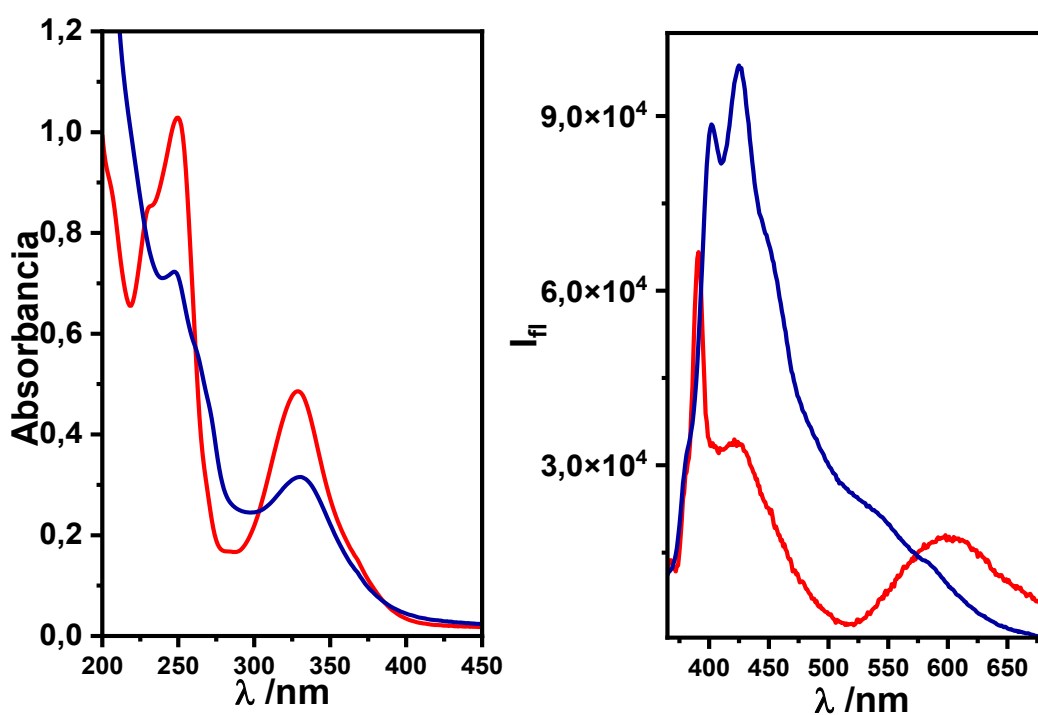
El diseño del inmunosensor estuvo basado en un inmunoensayo competitivo indirecto. En este caso, la competencia se llevó a cabo entre la STE y un hapteno competidor, formado por STE enlazada a los puntos cuánticos de MPA/MES CdSe (CdSe@STE), por una cantidad limitada y constante de anticuerpo monoclonal anti esterigmatocistina (mAb-STE), el cual se encuentra inmovilizado sobre la superficie del inmunosensor. Así, primeramente, se iniciaron los estudios de conjugación de STE con los puntos cuánticos de CdSe.

El uso de STE unida a nanomateriales con propiedades electroquimioluminiscentes, abre la posibilidad de desarrollar sensores electroquimioluminiscentes altamente sensibles en donde la respuesta, por ser un formato competitivo, es inversamente proporcional a la concentración de STE presente en la muestra. Así, se conjugó STE con los puntos

cuánticos de CdSe siguiendo el procedimiento detallado en la sección experimental, para lo cual inicialmente se realizó una síntesis de modificación estructural de la STE convirtiéndola en su forma hemiacetal (abreviado STE-OH) y, posteriormente, su conjugación con puntos cuánticos de CdSe.

### 19.2.1. Caracterización de la STE-OH

Con el fin de verificar la formación de la estructura hemiacetal en la STE, se realizaron las mediciones de absorción y emisión de fluorescencia tanto para la STE como para su forma hemiacetal, los cuales se muestran en la Figura 83.

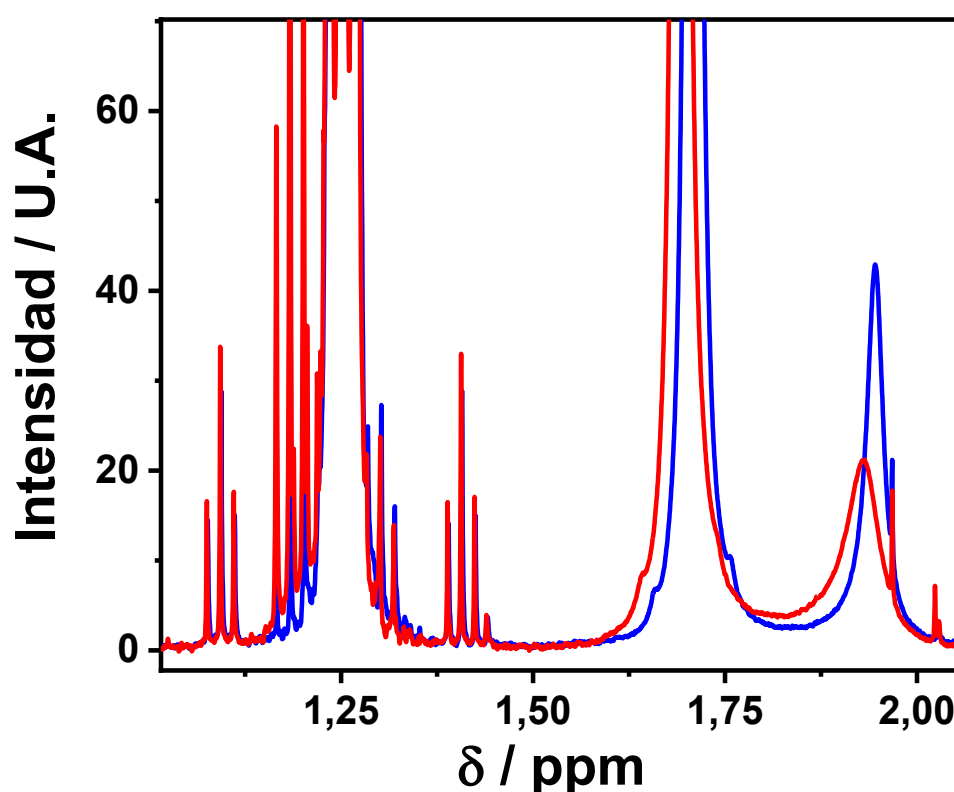


**Figura 83.** Espectros de absorbancia (izquierda) y emisión de fluorescencia corregida por absorbancia (derecha) para STE (—) y STE-OH (—) en solución de etanol.  $\lambda_{exc}=350$  nm.

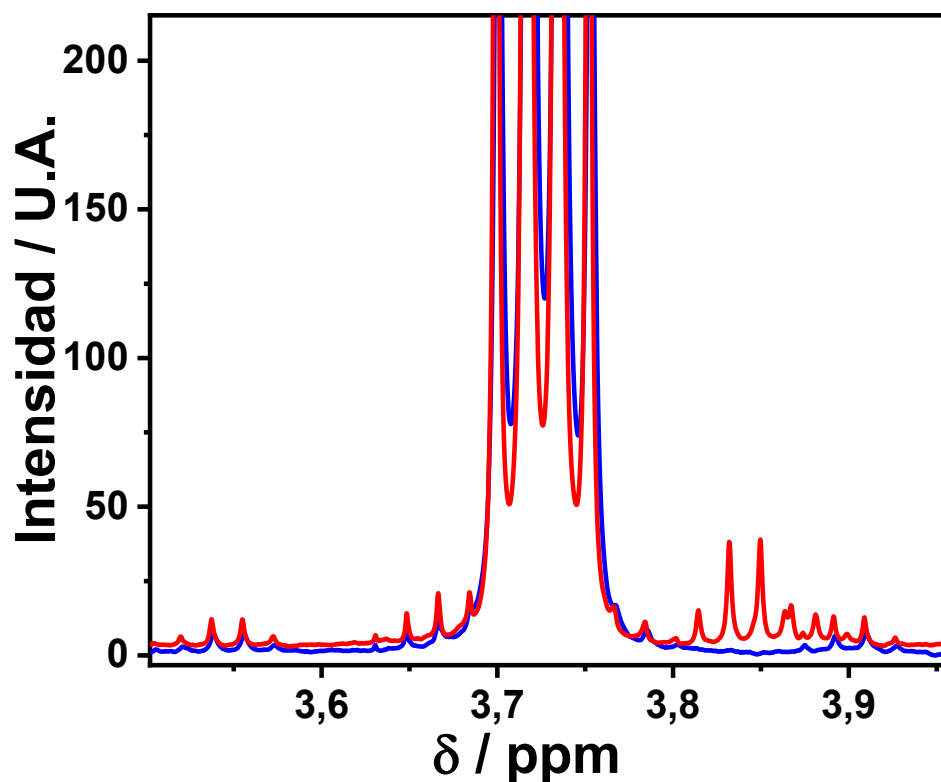
En relación con los máximos de absorbancia de la STE-OH en comparación con la STE, se observó un ligero corrimiento de los máximos de absorción, producto de la formación del hemiacetal que afecta la conjugación electrónica<sup>335</sup>. Además, se observa la desaparición del hombro centrado a 230 nm.

El espectro de fluorescencia de la Figura 83 muestra la intensidad de fluorescencia de la STE (línea magenta) y su derivado hidroxilado (STE-OH, línea azul) en solución de etanol bajo excitación a 350 nm. Se observa que la STE-OH presenta una banda de intensidad de fluorescencia más ancha en comparación con la intensidad de fluorescencia correspondiente a la STE, lo que comprueba la formación de la estructura hemiacetal y el efecto del grupo OH en la estructura química de la STE original<sup>336</sup>. Por otra parte, cabe resaltar la desaparición de la banda de emisión de intensidad de fluorescencia de la STE a 600 nm, confirmando los cambios estructurales sufrido en la síntesis y formación de la estructura hemiacetal.

Adicional a las mediciones de espectroscopia UV-Vis y emisión de fluorescencia, fueron realizados los espectros RMN<sup>1</sup>H para caracterizar la formación de la STE-OH. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H de STE (línea azul) y STE-OH (línea roja) a distintos intervalos de medición en ppm se muestran en la Figura 84 y Figura 85.



**Figura 84.** Espectros RMN<sup>1</sup>H en cloroformo deuterado para la STE (—) y STE-OH (—) visto desde el intervalo 0 ppm - 2,3 ppm.



**Figura 85.** Espectros RMN<sup>1</sup>H en cloroformo deuterado para la STE (—) y STE-OH (—) visto desde el intervalo 3.5 ppm - 4 ppm.

De acuerdo con la Figura 84, se observan desplazamientos de pico de STE con respecto a STE-OH en la región entre 1,5 y 2 ppm debido a cambios en los entornos químicos de los hidrógenos alifáticos del núcleo de bifurano. Además, se observa un nuevo multiplete a 3,85 ppm para el espectro de STE-OH, asignado a la división de la señal correspondiente al hidrógeno en la posición alfa, debido al grupo OH del hemiacetal (Figura 85) <sup>337</sup>.

Tanto para STE como para STE-OH, el hidrógeno de OH en el núcleo de xantona de STE y STE-OH, así como el hidrógeno de OH del grupo hemiacetal en STE-OH, no se observan debido al rápido intercambio de protones. Los espectros de RMN presentados, confirman la conversión de la STE a su forma hidroxilada (STE-OH). Una vez formado el grupo hemiacetal, se utilizó el mismo como sitio de unión con los puntos cuánticos de CdSe.

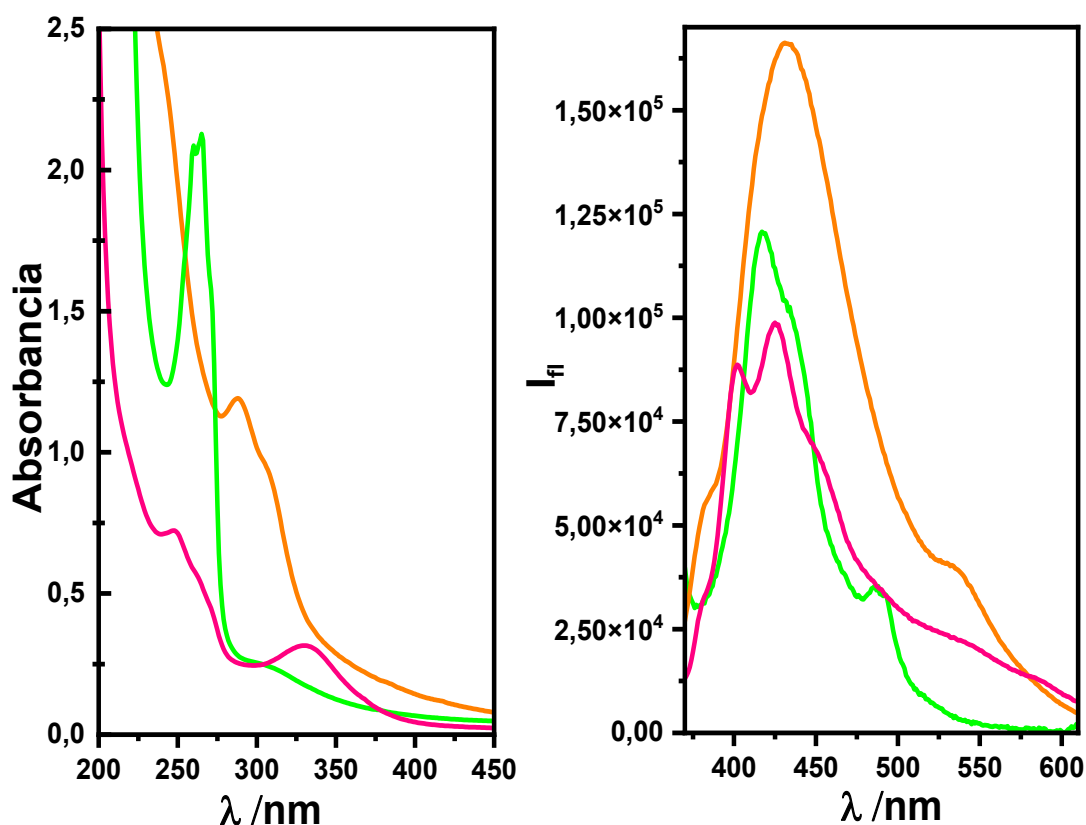
### 19.2.2. Caracterización óptica del bioconjugado CdSe@STE

La conjugación de la STE-OH con los QD de CdSe permitió seguir, de manera indirecta, la respuesta electroquimioluminiscente para las interacciones Ab - Ag del inmunosensor. Para lograr la conjugación, en una primera etapa, se modificaron los QD de CdSe a través de la unión con un espaciador, aminoácido lisina (L-lys), mediante la formación de un enlace covalente entre la amina primaria de la L-lys y el grupo carboxílico del tiol MPA presente en la superficie del QD, como se describió en la sección experimental. Al unir el aminoácido L-lys queda disponible un grupo carboxilo para la unión a la STE. La unión del QD CdSe modificado con L-lys con la STE-OH (abreviado CdSe@STE) se denominó bioconjugado.

Al bioconjugado obtenido se lo caracterizó por técnicas espectroscópicas. Se realizaron espectros UV-vis y fluorescencia, los cuales se compararon con los espectros obtenidos para la STE-OH y los QD de CdSe con relación molar 30/70 MPA/MES purificados y disueltos en solución tampón borato, pH 8,8.

De acuerdo con los espectros de absorción que se muestran en la Figura 86, los QD de CdSe 30/70 MPA/MES purificados (línea naranja) muestran una banda a 288 nm con un hombro a 307 nm respectivamente, indicando la presencia de dos poblaciones de diferentes tamaños de QD CdSe. En cuanto a su emisión de fluorescencia se puede observar una banda centrada a 470 nm, de alta intensidad de emisión.

El bioconjugado CdSe@STE muestra, en su espectro de absorción (línea verde), dos máximos en 264 nm y 303 nm los cuales se relacionan con máximos de absorbancia de STE-OH (Figura 83) y los puntos cuánticos de CdSe respectivamente, indicando la unión de ambos compuestos en la síntesis desarrollada. En cuanto a su emisión de fluorescencia, se puede observar que aparecen las bandas de emisión características de la STE-OH y los QD de CdSe. La emisión del bioconjugado exhibe un ligero corrimiento espectral, lo que indica una interacción electrónica entre el CdSe y la STE-OH.

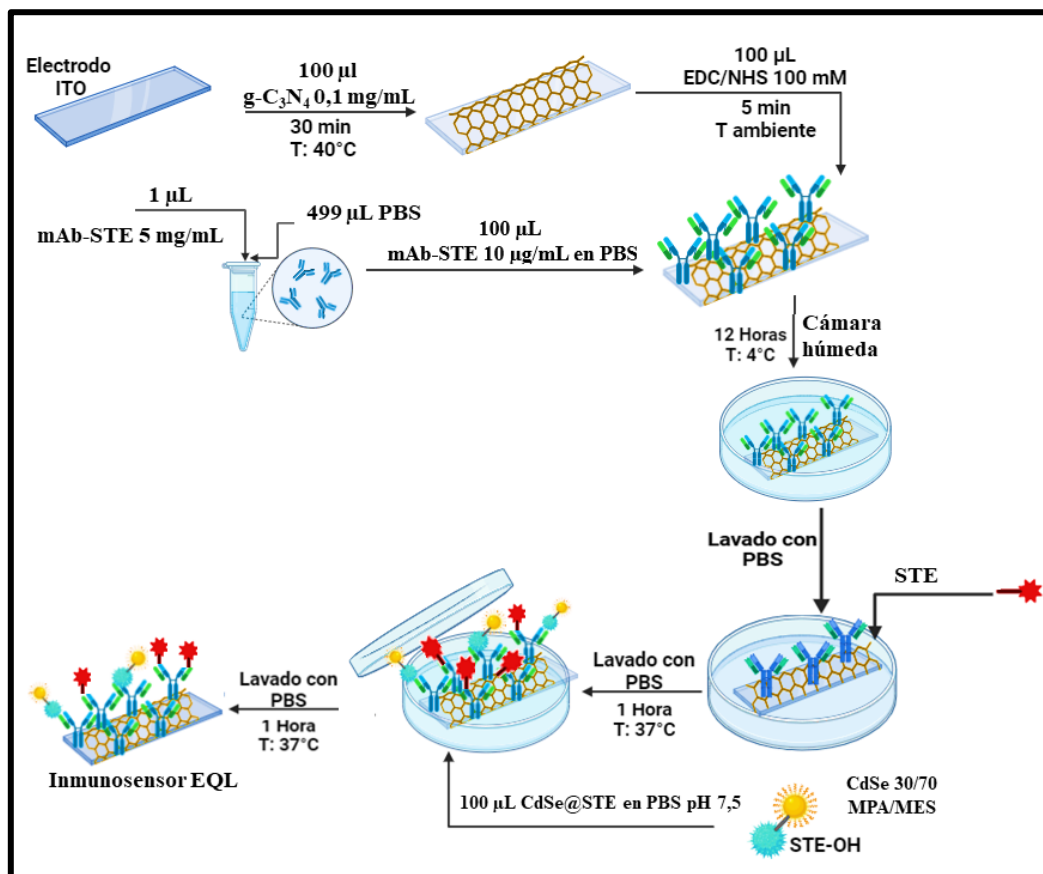


**Figura 86.** Espectros de absorción (izquierda) y emisión de fluorescencia (derecha) para QD 30/70 MPA/MES CdSe (—), STE-OH (—) y el bioconjugado CdSe@STE (—) en solución tampón borato pH 8,8.  $\lambda_{exc}=350$  nm.

### 19.3. Construcción del inmunosensor electroquimioluminiscente

El diseño del inmunosensor consistió en la inmovilización de los anticuerpos sobre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> previamente adsorbido sobre la superficie del electrodo ITO. Inicialmente se realizó la modificación de la superficie del electrodo ITO. Para ello, sobre el ITO, se agregaron 100  $\mu$ L de g-C<sub>3</sub>N 0,1 mg/mL, y se llevaron a una estufa a 40°C para su secado durante 30 min. Luego, sobre el ITO modificado, se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de mAb-STE 10  $\mu$ g/mL en PBS, pH 7,5 junto con 100  $\mu$ L de una solución de EDC/NHS 100 mM en PBS, pH 7,5, los cuales permitieron la unión entre los grupos aminos terminales del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los grupos carboxilos terminales del mAb-STE. La reacción de inmovilización de los mAb-STE en el ITO modificado se realizó por 12 horas en una atmosfera húmeda a 4°C. Luego, se lavó el inmuno - electrodo con PBS para eliminar los mAb-STE no unidos covalentemente, formando así el inmunosensor.

Para el inmunosensor final se determinaron las condiciones óptimas de ensamble. Para ellos se realizó el estudio de caracterización de la superficie modificada con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, así como también la concentración de mAb-STE. El procedimiento de ensamble del inmunosensor se muestra en la Figura 87.

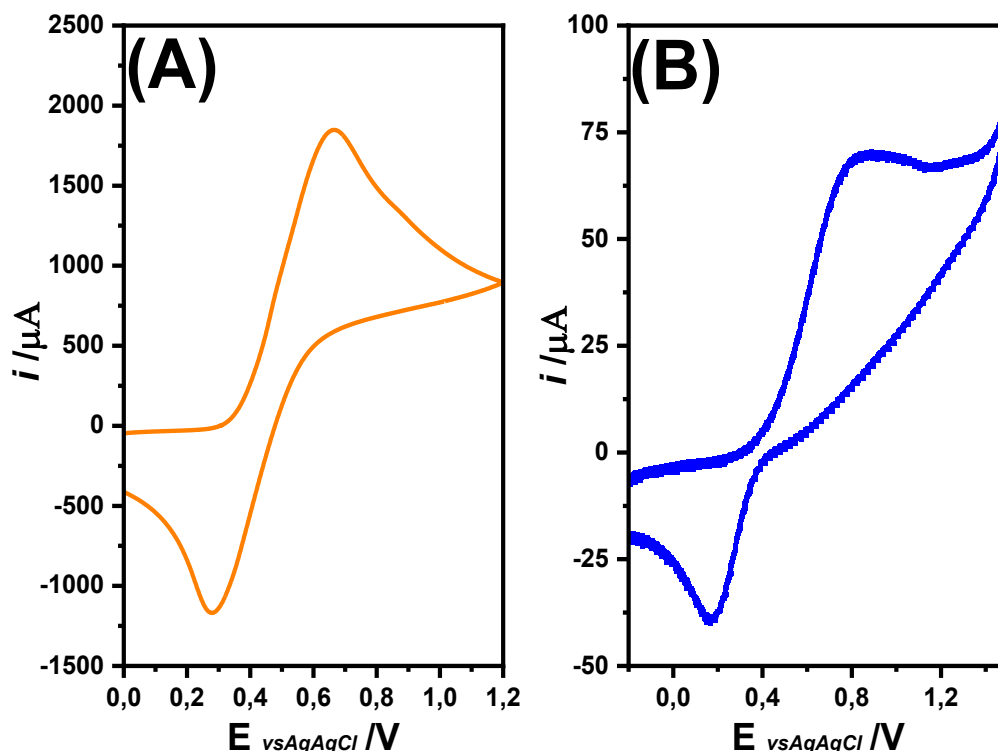


**Figura 87.** Diseño del inmunosensor de EQL para la detección de STE utilizando mAb-STE inmovilizados en la superficie de un electrodo ITO previamente modificado con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

### 19.3.1. Caracterización electroquímica de la superficie del inmunosensor

Se analizó la respuesta electroquímica de electrodos ITOs sin modificar y modificado. Para ello se utilizó el par redox (Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>3-/4-</sup>, 2,5 mM de cada uno de ellos, en solución acuosa de KCl 0,1 M. Al electrodo modificado con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se lo lavó con solución KCl 0,1 M para retirar el exceso de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> no adherido al ITO. El electrodo no modificado se dejó en secado a temperatura ambiente sin tratamiento alguno. A través de la técnica voltamperometría cíclica se realizaron 10 barridos en solución KCl 0,1 M a

cada electrodo para estabilizar las superficies, en una ventana de potencial comprendida desde  $-0,2$  V hasta  $0,8$  V, a una velocidad de barrido de  $50$  mV/s. Posteriormente, los electrodos se llevaron a la celda conteniendo la solución de  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}/(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$ , y se realizó el barrido de potencial bajo las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 88. La misma experiencia fue realizada con un electrodo ITO sin modificar.



**Figura 88.** Voltamperogramas cíclicos de  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}/(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$   $5$  mM en  $0,1$  M de KCl usando electrodos ITOs sin modificar (A) y modificados con  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  (B).  $\nu = 50$  mV/s.

En el voltamperograma A, correspondiente al electrodo sin modificar, se observa una corriente significativamente mayor, con un comportamiento cuasi reversible bien definido, en donde la relación de  $I_{p,c}/I_{p,a}$  es cercana a la unidad. Esto afirma la alta conductividad del ITO. En contraste, en el voltamperograma B, correspondiente al electrodo modificado con  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , la corriente decae y el  $\Delta E_p$  aumenta significativamente, con una relación  $I_{p,c}/I_{p,a}$  de  $0,33$ , lo que sugiere, por un lado, una disminución en la cinética de transferencia electrónica y, por el otro, una disminución del área electroactiva del electrodo debido al recubrimiento de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ . De acuerdo con la respuesta en corriente del electrodo modificado con el  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , se realizó un estudio para la determinación del

área electroactiva del electrodo modificado que, además, permitió conocer la reproducibilidad de la superficie modificada con el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Para este estudio, se utilizaron diez electrodos ITOs modificados. Se determinó el área electroactiva de los electrodos mediante cronoamperometría a partir de una solución acuosa de (Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>4-</sup> 5 mM en KCl 0,1 M como electrolito de soporte. Se realizaron cronoamperometrías aplicando un potencial de 0,2 V durante un tiempo de 60 segundos.

Aplicando la ecuación de Cottrell<sup>338</sup>:

$$i(t) = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o}{\pi^{1/2}} \times \frac{1}{\sqrt{t}} \quad (64)$$

siendo n el número de electrones transferidos en la reacción, F la constante de Faraday (96484 A s mol<sup>-1</sup>) y D<sub>o</sub> el coeficiente de difusión del ferrocianuro (6,3×10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>/s).

Graficando i(t) vs t<sup>-1/2</sup> se obtuvo una línea recta, cuya pendiente depende, entre otras variables conocidas, del área del electrodo. Así, a partir de la ecuación (64) y despejando el área de la pendiente obtenida (ecuación (65)), se determinó el área electroactiva para electrodos sin modificar, modificados con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y reutilizados, cuyos valores se muestran en la Tabla 14.

$$A_{\text{electrodo}} = \frac{\pi^{1/2}}{nFD_o^{1/2}C_o} \times m \quad (65)$$

siendo m la pendiente obtenida en la recta.

**Tabla 14.** Áreas promedias electroactivas para 10 electrodos ITOs nuevos, modificados con 100 µL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y reutilizados. Los valores promedio son el resultado de 10 electrodos con mediciones triplicadas.

| Electrodo                      | Nuevos sin uso | Modificados con g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | Reutilizados |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------------------------|--------------|
| área promedio /cm <sup>2</sup> | 4,15           | 0,39                                            | 3,16         |
| Desv. Estándar                 | 10,57 %        | 20,84 %                                         | 23,26 %      |

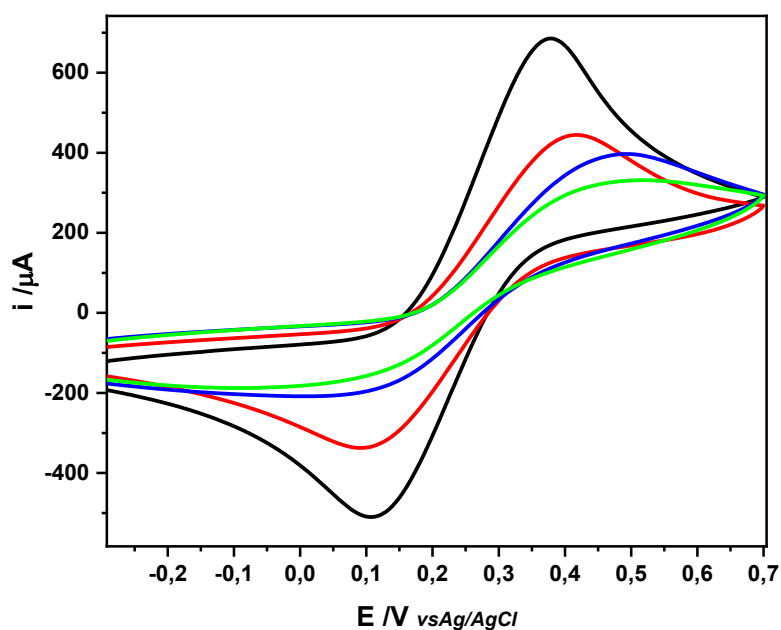
Se observa que los electrodos ITO nuevos tienen un área electroactiva significativamente mayor (4,16 cm<sup>2</sup>), mientras que los modificados con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> muestran una reducción drástica del área activa (0,39 cm<sup>2</sup>), lo que representa una disminución del 90,6%. Sin

embargo, tras su reutilización, los electrodos recuperan parcialmente su area electroactiva ( $3,16 \text{ cm}^2$ ), lo que sugiere que el recubrimiento de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  afecta temporalmente la conductividad del electrodo y que su reutilización permite recuperar parte de su funcionalidad.

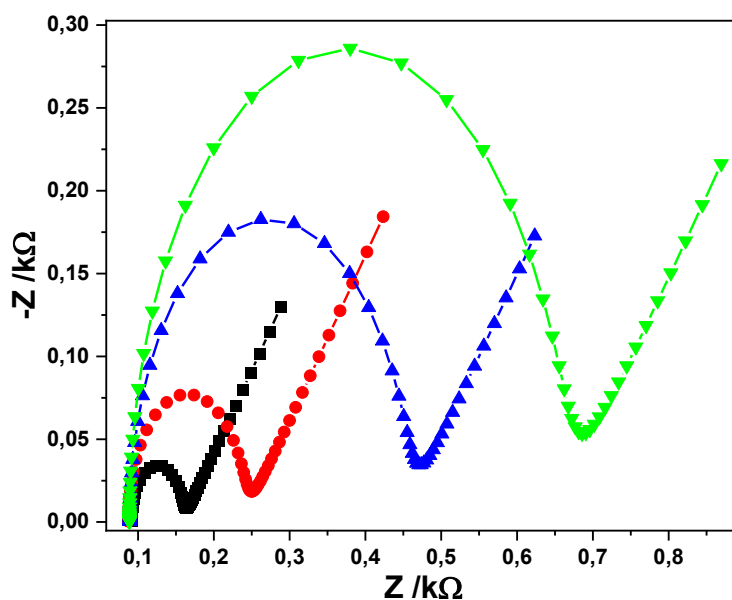
Desde una perspectiva analítica, la modificación con  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  reduce el área electroactiva. No obstante, esta modificación es ventajosa en términos de que el recubrimiento de  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  puede favorecer la adsorción de biomoléculas específicas y reducir interferencias. La reutilización de los electrodos representa una ventaja en términos de costo y sostenibilidad, aunque con una variabilidad en la respuesta electroquímica más alta (23,26% de desviación estándar).

Para investigar el comportamiento electroquímico del inmunosensor, se estudiaron las modificaciones de la superficie del electrodo utilizando técnicas de CV y EIS con el objetivo de caracterizar la superficie del inmunosensor diseñado y evaluar las modificaciones sucesivas del electrodo durante cada etapa de ensamblaje. Esta técnica permitió analizar los cambios en la resistencia a la transferencia de carga y en el comportamiento capacitivo de la interfaz electrodo – solución, asociados a la inmovilización de los nanomateriales y de los elementos de reconocimiento biológico. Los resultados de EIS proporcionaron certeza del correcto acondicionamiento superficial del inmunosensor.

Paras las lecturas de EIS se utilizó el par redox  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}/(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$ , 2,5 mM de cada uno de ellos, en solución acuosa de KCl 0,1 M; se realizaron las lecturas de voltamperometría cíclica y EIS para el electrodo ITO desnudo, ITO modificado con  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  (ITO/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$ ), el electrodo ITO/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$  con los anticuerpos monoclonales inmovilizados (ITO/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /mAb-STE) y finalmente el electrodo ITO/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /mAb-STE con BSA que actuó como bloqueador de sitios de uniones no específicas entre los mAb-STE y la superficie modificada del ITO. Los resultados se muestran en la Figura 89 y la Figura 90 respectivamente.



**Figura 89.** Voltamperogramas cíclicos de electrodo ITO desnudo (—), ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/mAb-STE (—) y ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/mAb-STE/BSA (—) en una solución de (Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>3-</sup>/(Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>4-</sup> 5 mM en 0,1 M de KCl.  $\nu = 50$  mV/s.



**Figura 90.** EIS de la cupla (Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>3-</sup>/(Fe(CN)<sub>6</sub>)<sup>4-</sup> 5 mM en 0,1 M de KCl para el electrodo ITO desnudo (—), ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (—), ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/mAb-STE (—) y ITO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/mAb-STE/BSA (—).

La Figura 89 muestra los voltamperogramas cíclicos registrados en la sonda redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  sobre un electrodo ITO en distintas etapas de modificación superficial, evidenciando una disminución progresiva de las corrientes anódicas y catódicas a medida que se incorpora  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , los mAb-STE y finalmente BSA. El electrodo ITO/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$  conserva una respuesta electroquímica relativamente elevada, coherente con la naturaleza semiconductor del material, mientras que la inmovilización del mAb-STE y el bloqueo con BSA generan una atenuación adicional de la señal<sup>339</sup>.

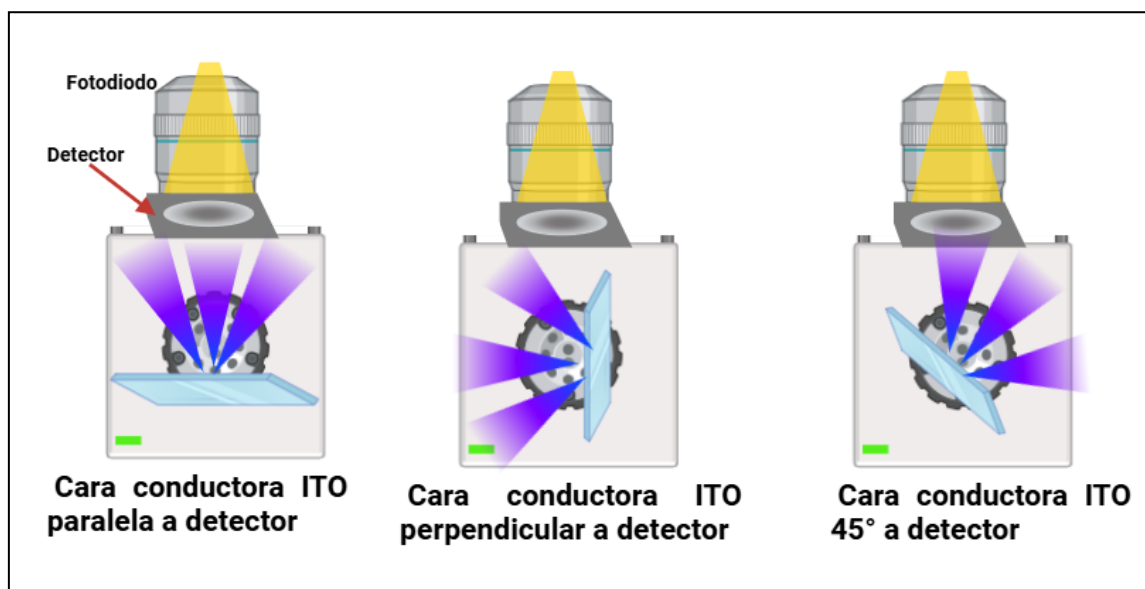
La Figura 90 por su parte, presenta los diagramas de Nyquist obtenidos por EIS para el electrodo ITO en distintas etapas de modificación. El ITO desnudo muestra el menor valor de resistencia de transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) de  $67,2 \, \Omega$  mostrando una cinética rápida de intercambio electrónico con el par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , mientras que la modificación con  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  incrementa la  $R_{ct}$  hasta  $151,8 \, \Omega$  debido a la naturaleza semiconductor y a la introducción de una barrera parcial al transporte de carga. La inmovilización del mAb-STE genera un aumento significativo de  $R_{ct}$  hasta  $362,1 \, \Omega$ , atribuible a la formación de una capa proteica eléctricamente aislante que dificulta el acceso del mediador redox a la superficie. Finalmente, el bloqueo con BSA eleva la  $R_{ct}$  a  $565,8 \, \Omega$ , confirmando la pasivación efectiva de sitios no específicos y la correcta formación de la interfaz bio-funcional, coherente con la respuesta esperada para un inmunosensor correctamente ensamblado<sup>340</sup>.

### **19.3.2. Orientación de la cara conductora modificada del ITO hacia el detector de emisión**

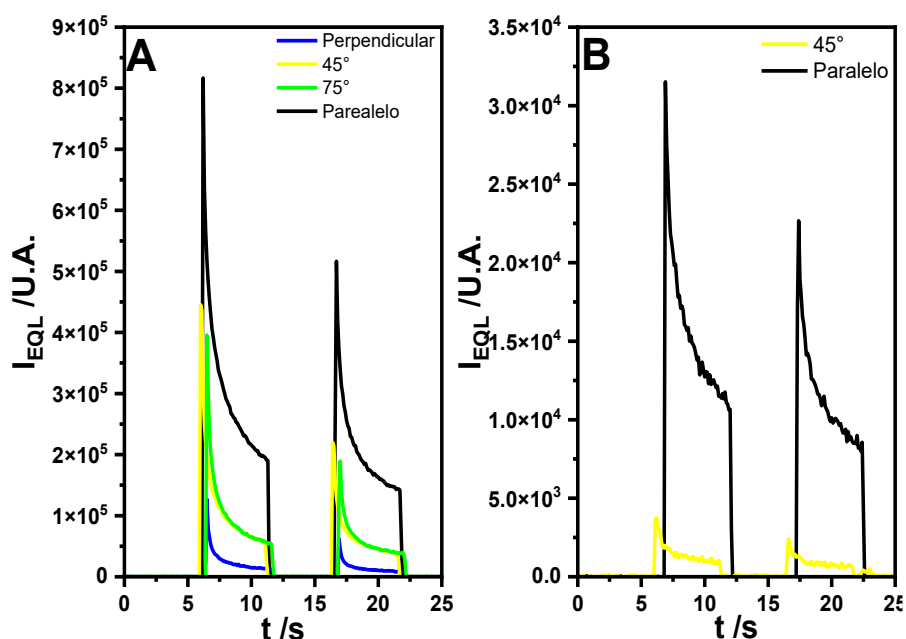
Dentro de los aspectos que se tuvieron en cuenta para las lecturas de EQL en el inmunosensor y que permitieron la detección de la mejor respuesta y, por consiguiente, mayor sensibilidad en la detección fue la orientación de la cara conductora del electrodo ITO modificado hacia el detector de emisión. Se realizaron las mediciones de EQL bajo los mismos parámetros previamente mencionados con variaciones del ángulo de orientación de la cara conductora del ITO modificado hacia el lente del detector (Figura 91), teniendo en cuenta el accesorio del equipo de detección descrito en la sección de metodología. Los resultados se muestran en la Figura 92.

La intensidad de EQL del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> adsorbido sobre la superficie de ITO que llega al detector depende críticamente de su orientación, ya que los resultados indican que la disposición del ITO paralela al detector maximiza la detección de la EQL en comparación con orientaciones perpendiculares, a 45° y a 75°. En contraste, la Figura 92 B muestra que cuando se orienta la cara no conductora hacia el detector de manera perpendicular la intensidad de EQL detectada es más baja, lo cual se explica por las pérdidas ópticas relacionadas con la dispersión de la luz y a efectos de refracción y reflexión interna.

De acuerdo con estos resultados se determinó que la orientación paralela es la mejor para la cuantificación de las respuestas de EQL del inmunosensor.



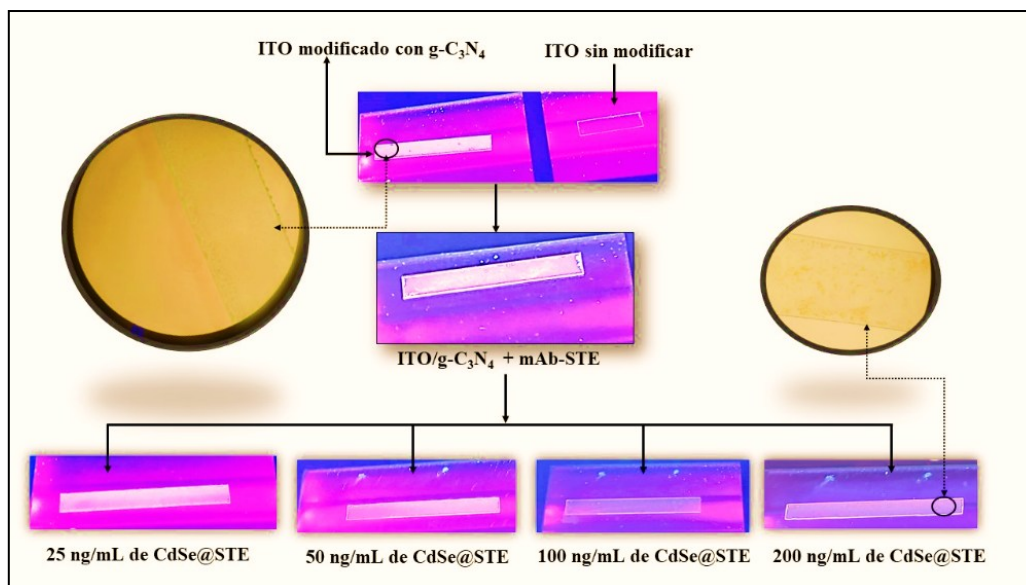
**Figura 91.** Orientación de la cara conductora del ITO modificado con g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en relación con el detector de emisión del equipo.



**Figura 92.** Transitorios de EQL para g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> adsorbido sobre la superficie conductora del ITO con diferentes orientaciones en relación con el detector de emisión: frente su cara conductora al detector (A) y orientando su cara no conductora al detector (B).

### 19.3.3. Determinación de la concentración óptima de bioconjugado CdSe@STE

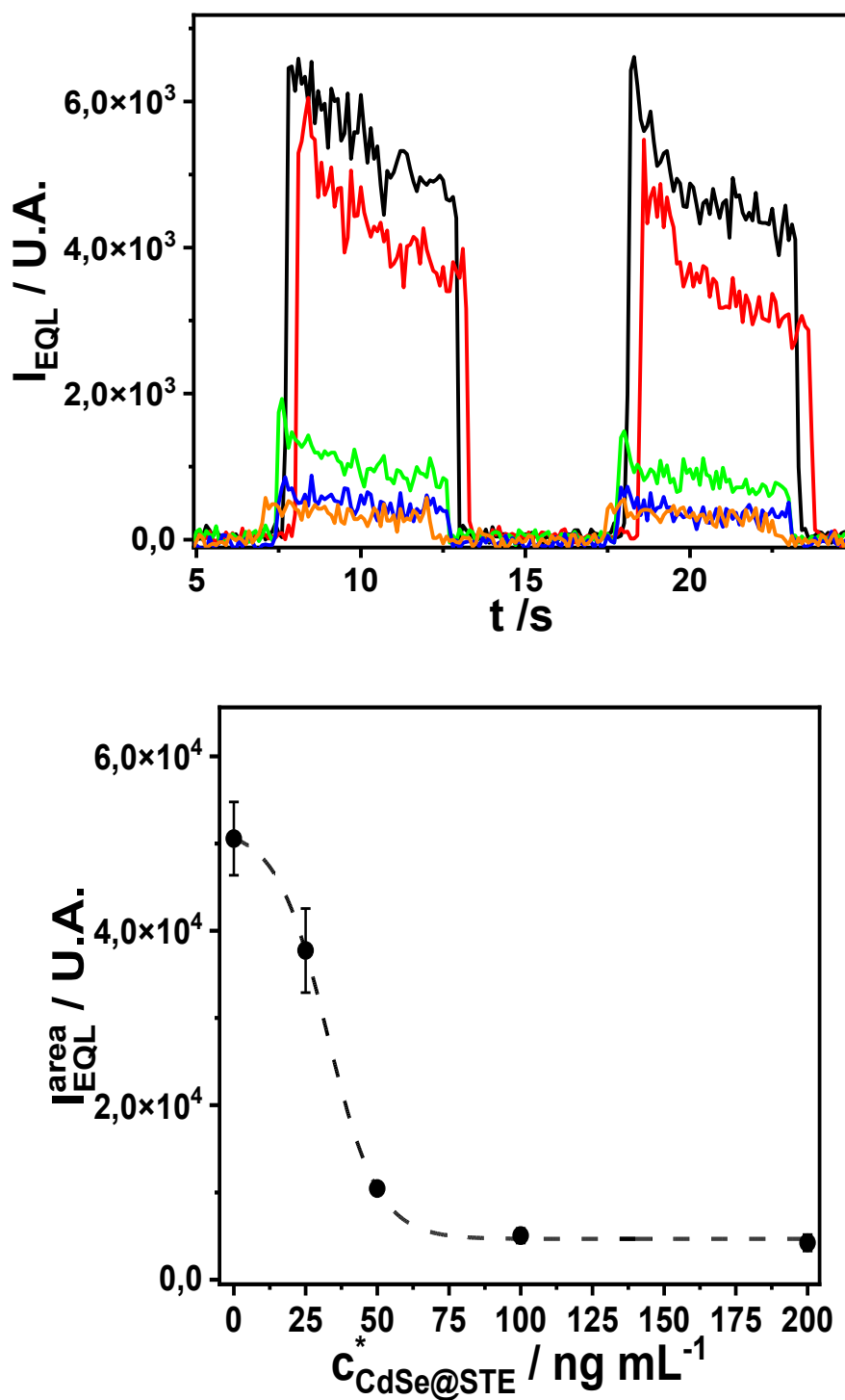
El bioconjugado CdSe@STE tiene la finalidad de ser el responsable de la variación de la señal frente a diferentes concentraciones de STE. Así, indirectamente, se determina la presencia de STE a través de la respuesta de emisión de EQL, en donde la señal disminuye con el aumento de la concentración de STE. Dentro de los estudios realizados para comprobar la efectiva interacción entre el bioconjugado CdSe@STE y mAb-STE, se realizó un análisis de la detección del bioconjugado a concentraciones de 0, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL y 200 ng/mL en PBS, las cuales se agregaron a cinco inmunosensores diferentes en ausencia de STE. La Figura 93 muestra los inmunosensores ensamblados bajo irradiación UV-Vis para las distintas concentraciones de CdSe@STE, donde se observó que la emisión de luminiscencia disminuye a medida que la concentración de CdSe@STE se incrementó en el inmunosensor.



**Figura 93.** Inmunosensores EQL para la detección de STE a diferentes concentraciones de CdSe@STE bajo irradiación de luz UV-Vis. los círculos muestran las superficies de electrodos vistas desde un microscopio x100.

Las medidas de EQL fueron realizadas siguiendo el procedimiento on – off descrito en la metodología experimental, en donde se obtuvo la curva de  $I_{EQL}$  vs.  $c_{CdSe@STE}$  que se muestra en la Figura 94.

Para el inmunosensor formado con 10  $\mu\text{g/mL}$  de mAb-STE se obtuvieron transitorios electroquimioluminiscentes a distintas concentraciones de bioconjugado CdSe@STE (Figura 94, arriba), en donde se observó una disminución del  $I_{EQL}$  a medida que aumenta la concentración de bioconjugado CdSe@STE. Por su lado, en la Figura 94, abajo, se observa que a medida que aumenta la concentración de bioconjugado CdSe@STE disminuye la señal alcanzando una meseta para concentraciones superiores a 100  $\text{mg/mL}$ . Este comportamiento se atribuye a un fenómeno de extinción de la emisión luminiscente a altas concentraciones de puntos cuánticos de CdSe. Por lo tanto, para realizar un inmunoensayo competitivo con la señal más alta, se seleccionó una concentración de 25  $\text{ng/mL}$  para el hapteno competitivo. No se evaluaron concentraciones más bajas de CdSe@STE debido a que, en inmunoensayos competitivos, se obtiene una pseudo-reacción de competencia con STE, lo que resulta en una variación mínima de la señal para pequeños cambios en la concentración de STE. Este efecto produce una curva de competencia dosis-respuesta caracterizada por una pendiente pequeña, y acotado rango dinámico de concentración de detección de analito.

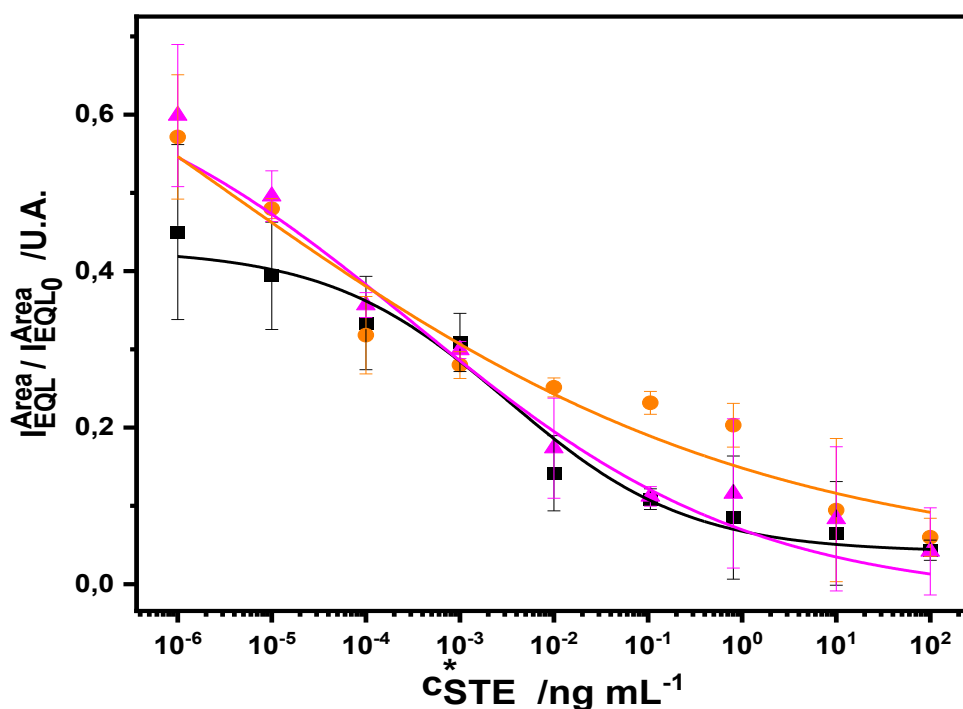


**Figura 94.** Arriba: transitorios de EQL del inmunosensor a 0 (—), 25 ng/mL (—), 50 ng/mL (—), 100 ng/mL (—) y 200 ng/mL (—) de  $CdSe@STE$  en Tris-HCl, pH 7,4 usando TEA, aplicando saltos de potencial de -0,2 V a 1,3 V. Abajo: curva  $I_{EQL}$  vs  $C_{CdSe@STE}$ , para 10  $\mu g/mL$  de mAb-STE.

#### 19.3.4. Concentración óptima de mAb-STE

Al igual que se realizó con el bioconjugado, se determinó la concentración óptima de mAb-STE para el ensamble del inmunosensor. Una baja concentración de anticuerpo permite una competencia a bajas concentraciones de antígeno, obteniendo una gran sensibilidad, pero escaso intervalo de trabajo de concentraciones del analito de interés. Por el contrario, una alta concentración de anticuerpo permite una competencia para un gran intervalo de concentraciones de analito en detrimento de la sensibilidad del inmunosensor<sup>341</sup>.

A partir de este análisis, se realizaron estudios para determinar la concentración a utilizar de anticuerpo para el inmunosensor que permitiese obtener alta sensibilidad a diferentes variaciones de STE con rango dinámico lineal de concentraciones de STE amplio. Se utilizaron concentraciones de mAb-STE de 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  y 20  $\mu\text{g/mL}$  en la construcción del inmunosensor para distintas concentraciones de STE en presencia de 25  $\text{ng/mL}$  de  $\text{CdSe@STE}$ . Los resultados se muestran en la Figura 95.



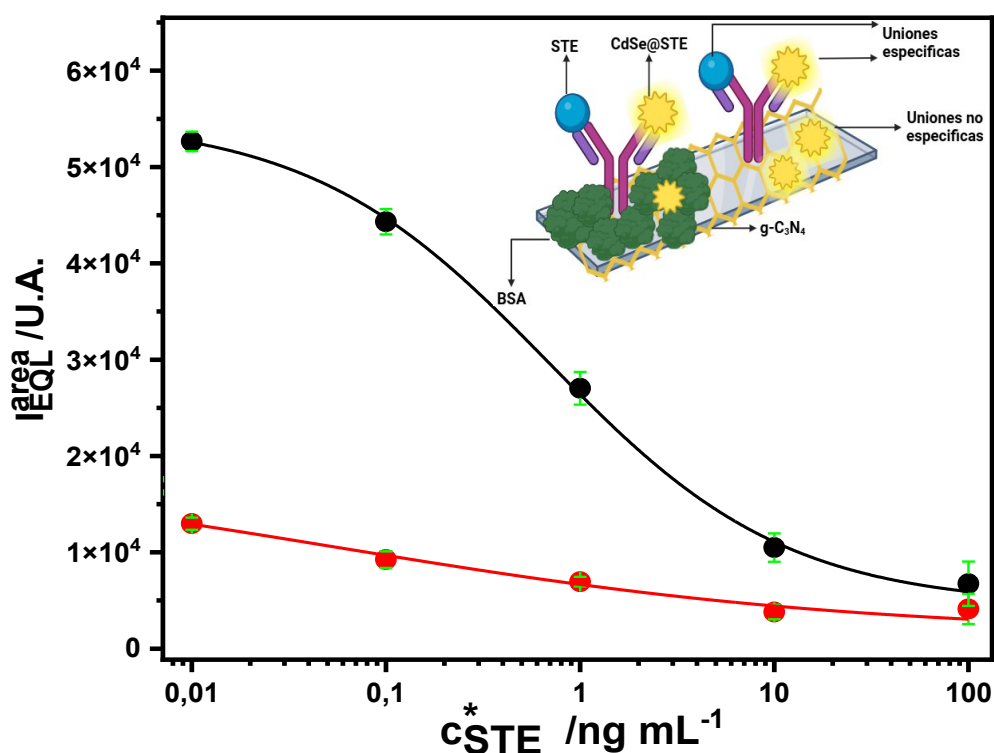
**Figura 95.** Curva  $I_{EQL}/I_{EQL0}$  vs.  $\text{Log } c_{STE}$  del análisis competitivo para el inmunosensor de electroquimioluminiscencia en presencia de 25  $\text{ng/mL}$  de  $\text{CdSe@STE}$  para concentraciones de mAb-STE de 5  $\mu\text{g/mL}$  (curva negra), 10  $\mu\text{g/mL}$  (curva magenta) y 20  $\mu\text{g/mL}$  (curva naranja).

Todas las curvas presentan una disminución de la señal a medida que aumenta la concentración de STE, lo que indica un mecanismo competitivo donde el STE en solución compite con el bioconjugado CdSe@STE por los sitios de unión del anticuerpo. La curva negra (concentración de mAb-STE de 5  $\mu\text{g/mL}$ ) muestra una saturación de la señal para concentraciones de STE mayores, cercanas a 1  $\text{ng/mL}$ . Para concentraciones de mAb-STE de 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  no se observa una saturación, en donde las intensidades de señal son similares. De acuerdo con estos resultados, la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de mAb-STE (curva magenta) fue la concentración seleccionada para el ensayo de inmunosensor final.

#### **19.3.5. Bloqueo de los sitios de uniones no específicas con BSA**

La albúmina sérica bovina (BSA) se utiliza en el ensamble de inmunosensores para bloquear sitios de unión no específicos en la superficie del sensor, evitando la adsorción no deseada de los analitos en la superficie del electrodo y reducir el ruido de fondo. Su efectividad radica en su estructura globular y su capacidad para cubrir de manera uniforme superficies. Esto mejora la selectividad del inmunoensayo y permite una detección más precisa del analito de interés, asegurando que la señal generada proviene únicamente de la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno<sup>342</sup>. La Figura 96 muestra el efecto de la BSA sobre la emisión EQL en el inmunosensor.

En el inmunosensor desarrollado, se utilizó una solución de BSA 0,01  $\text{mg/mL}$  en PBS. Para ello, tras la inmovilización de los mAb-STE sobre el ITO modificado, se añadió la solución de BSA a cada inmunosensor y se incubó en una cámara húmeda durante 30 minutos. Luego, se realizaron lavados con PBS para eliminar el exceso de BSA no adsorbida, y se procedió con la interacción Ab - Ag. Como resultado, se observa una disminución de la EQL en presencia de BSA (curva roja), lo que indica que sin BSA, probablemente el bioconjugado se adsorba de manera inespecífica sobre el electrodo. Así, la presencia de BSA nos asegura que la respuesta se debe a la interacción específica de mAb-STE y el bioconjugado CdSe@STE, permitiendo una cuantificación más confiable del analito<sup>343</sup>.



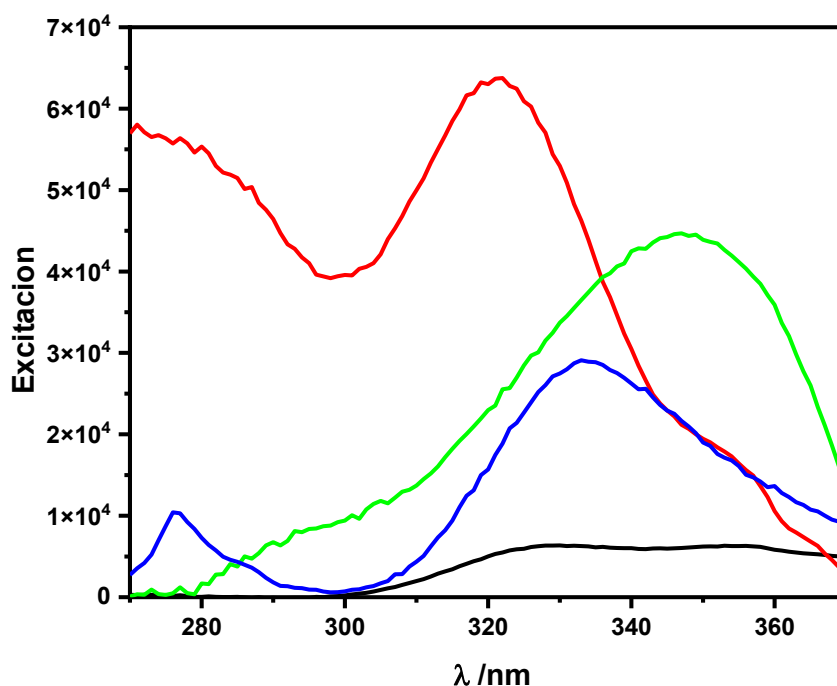
**Figura 96.** Curvas de calibración para el inmunosensor a diferentes concentraciones de STE en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE con agregado de BSA 0,01 mg/mL (—) y sin agregado de BSA (—). Inserto: descripción de las interacciones específicas y no específicas en el inmunosensor. La concentración de mAb-STE fue de 10  $\mu$ g/mL.

#### 19.4. Análisis de la anisotropía de fluorescencia del inmunosensor

La anisotropía de fluorescencia se empleó como una herramienta para verificar que el mAb-STE en el inmunosensor tiene actividad de reconocimiento hacia el bioconjugado CdSe@STE. El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> actúa como luminóforo dador de energía, permitiendo un proceso de transferencia de energía hacia el QD CdSe incorporado en el bioconjugado, el cual actúa como aceptor y emisor, como se describió previamente. La anisotropía de fluorescencia permitió monitorear esta interacción biomolecular, ya que la unión específica del antígeno al anticuerpo genera cambios en la movilidad rotacional del bioconjugado, reflejados en la variación del valor de anisotropía de CdSe@STE.

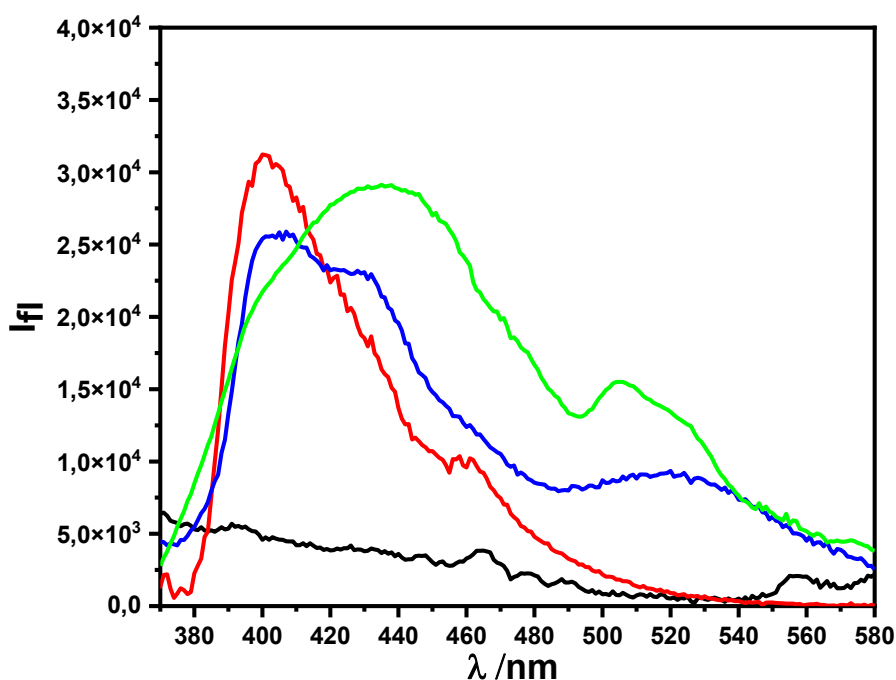
Previo a las mediciones de anisotropía, se realizaron los espectros de excitación de los puntos cuánticos presentes en el bioconjugado CdSe@STE a una concentración de 25

ng/mL, tanto en PBS como sobre el inmunosensor CdSe@STE/mAb-STE/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ITO (Figura 97). En ambos casos se observó un máximo de absorbancia a 350 nm, consistente con valores previamente reportados para el bioconjugado CdSe@STE. Este valor de longitud de onda de absorción fue utilizado como longitud de onda de excitación para los estudios de fluorescencia. A partir de este parámetro de excitación, se registraron los espectros de emisión del bioconjugado en sus dos estados (libre y unido), y se compararon con los espectros de control correspondientes a g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y al electrodo ITO sin modificar, con el fin de garantizar que la señal observada corresponda específicamente al bioconjugado (Figura 98). Este enfoque permitió seleccionar la longitud de onda de emisión asociada a los puntos cuánticos CdSe en el bioconjugado, asegurando que las variaciones de anisotropía se deben al emisor.



**Figura 97.** Espectros de excitación para el electrodo ITO desnudo (—), g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> absorbido en ITO (—), inmunosensor CdSe@STE/mAb-STE/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ITO (—) y CdSe@STE libre (—) en PBS pH 7,5.

Como se observa en la Figura 98, los espectros de emisión de fluorescencia muestran un pico a 436 nm para el bioconjugado CdSe@STE libre, mientras que para CdSe@STE/mAb-STE/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ITO se muestran tres máximos a 409 nm, 430 nm y 517 nm, correspondientes a la emisión de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y al bioconjugado CdSe@STE, respectivamente<sup>344</sup>.



**Figura 98.** Espectros de emisión de fluorescencia para ITO desnudo (—), g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> absorbido en ITO (—), inmunosensor CdSe@STE/mAb-STE/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ITO (—) y CdSe@STE libre (—) en PBS pH 7,5.  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ .

Las mediciones de anisotropía en el inmunosensor se realizaron a 430 nm. Al unirse el bioconjugado CdSe@STE al complejo mAb-STE/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ITO, pierde su movilidad rotacional libre, lo que resulta en un cambio en la señal de anisotropía. Los resultados obtenidos mediante anisotropía de fluorescencia (

Tabla 15) permiten inferir la unión específica del bioconjugado CdSe@STE a los mAb-STE inmovilizados sobre la superficie del inmunosensor. Cuando el bioconjugado está libre (en ausencia del inmunosensor) en PBS presentó una baja anisotropía, característica de una alta movilidad rotacional, lo cual es esperable para especies en solución.

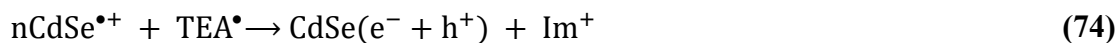
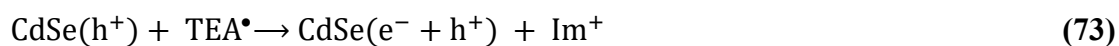
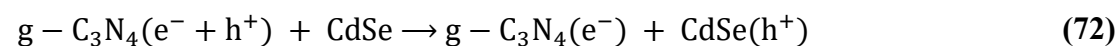
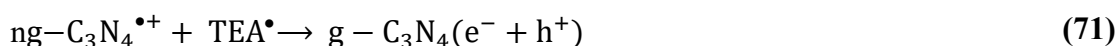
Sin embargo, tras la formación del inmunocomplejo (mAb-STE–CdSe@STE), se observa un incremento del valor de anisotropía, atribuible a la restricción rotacional inducida por la interacción Ab - Ag. Este cambio confirma la formación del inmuno-complejo, por lo tanto, STE enlazada al QD de CdSe es reconocida por el anticuerpo, por lo que el bioconjugado CdSe@STE puede actuar como hapteno competidor en el inmunosensor desarrollado.

**Tabla 15.** Valores de longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) y anisotropía de fluorescencia ( $r_0$ ) del bioconjugado CdSe@STE en solución y unido al mAb-STE en el inmunosensor.

| Muestra          | $\lambda_{Em}/nm$ | $r_0$        |
|------------------|-------------------|--------------|
| CdSe@STE in PBS  | 436               | 0,051± 0,005 |
| mAb-STE-CdSe@STE | 430               | 0,127± 0,003 |

### 19.5. Mecanismo de electroquimioluminiscencia del inmunosensor desarrollado

Teniendo en cuenta el comportamiento electroquímico y electroquimioluminiscente de cada uno de los elementos utilizados en el diseño y ensamble del inmunosensor se puede plantear el mecanismo de generación de la EQL. Tal y como se expresó para el mecanismo de EQL en la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, las mediciones de EQL se realizaron en solución tampón Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 M. De acuerdo con las condiciones previamente mencionadas y justificadas, así como de los datos bibliográficos el probable mecanismo para el sistema en estudio es



El mecanismo de EQL propuesto se inicia con la activación electroquímica del coreactante trietilamina (TEA), el cual es oxidada en la superficie del electrodo para generar el radical catión  $TEA^{\bullet+}$  (67). En medio tamponado con Tris, este radical

experimenta una deprotonación rápida, originando el radical neutro TEA<sup>•</sup>, una especie altamente reductora capaz de participar en reacciones de transferencia electrónica (68).

En paralelo, los QDs CdSe presentes en el bioconjugado y el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de la superficie electródica, pueden oxidarse electroquímicamente generando especies cargadas positivamente ((69) y (70) respetivamente). Estas especies oxidadas constituyen centros activos que permiten la inyección de cargas desde el radical TEA<sup>•</sup>, promoviendo la formación de pares ( $e^- + h^+$ ) dentro de los nanomateriales (71).

Debido a la configuración del inmunosensor y cercanía de ambos nanomateriales, la formación de una interfaz con una alineación específica de bandas de energía permite que los electrones y huecos generados electroquímicamente se desplacen de manera preferencial desde un nanomaterial hacia el otro, impulsados por los gradientes energéticos entre las BC y BV. Esta interfaz y acoplamiento energético facilita el mecanismo es la transferencia de cargas entre el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y los QDs del bioconjugado CdSe@STE<sup>345</sup>.

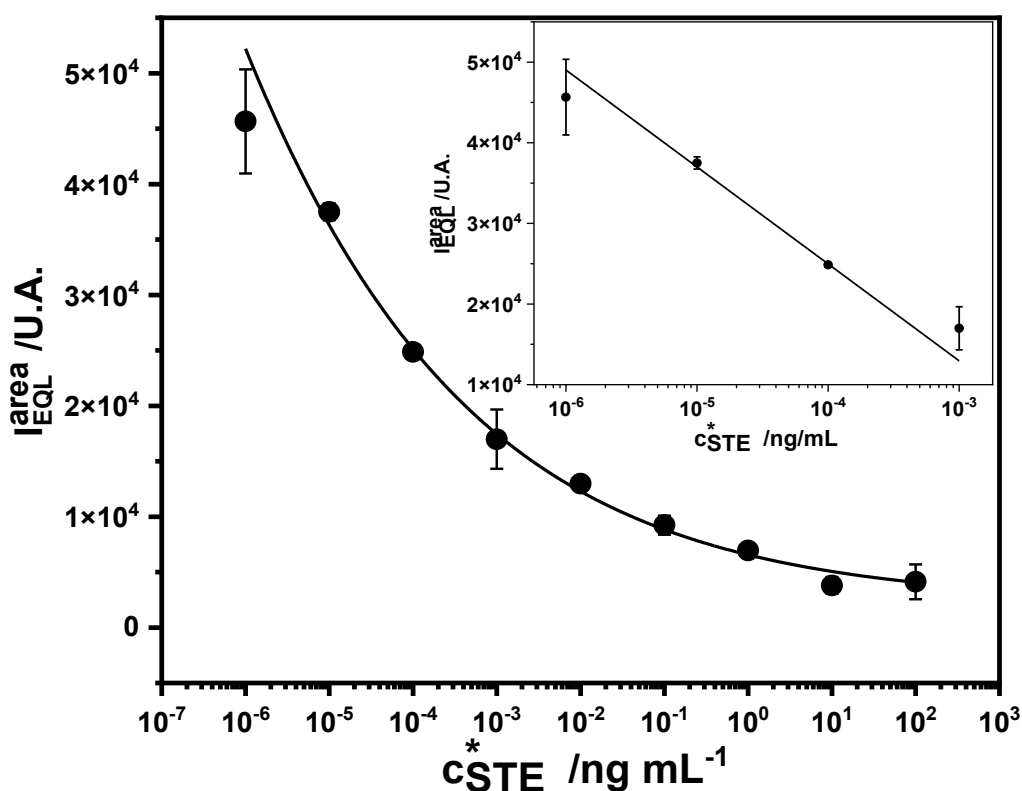
Tal y como se observó en la Figura 72, el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> actúa como mediador electrónico, aceptando una inyección de electrones en su BC por parte del radical TEA<sup>•</sup> y posteriormente, transfiriendo huecos hacia la BV del QD CdSe (72). Este proceso en donde el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> actúa como dador de huecos y el QD CdSe aceptor de los mismos, favorece la formación de pares ( $e^- + h^+$ ) en el QD. Adicionalmente, los huecos acumulados en el QD CdSe pueden reaccionar directamente con el radical TEA<sup>•</sup>, reforzando la generación de pares ( $e^- + h^+$ ) en el QD ((73)-(74))<sup>346</sup>.

Ambos mecanismos conducen a la acumulación eficiente de pares ( $e^- + h^+$ ) en el QD CdSe, que relaja hacia el estado excitado CdSe<sup>\*</sup> y finalmente emitiendo la EQL al retornar al estado fundamental (75).

Nótese, que la formación de la especie excitada de CdSe<sup>\*</sup> se ve doblemente favorecida debido a la oxidación del QD e inyección de electrones por parte del radical TEA<sup>•</sup>, así como también por el mecanismo RET entre ambos nanomateriales, razón por la que la EQL cuantificada proviene en gran proporción de los procesos radiativos del QD CdSe presente en el bioconjugado.

## 19.6. Detección de STE en solución patrón

Previo a la detección de STE en muestras reales de maíz, se realizó la detección de STE en soluciones patrones en PBS. Con las concentraciones optimizadas para el inmunoensayo, se construyó una curva de calibración para concentraciones de STE en un rango desde  $1 \times 10^{-6}$  ng/mL a 100 ng/mL, la que se muestra en la Figura 99.



**Figura 99.** Curva de calibración para el inmunosensor electroquimioluminiscente. Concentración de CdSe@STE = 25 ng/mL, y concentración de mAb-STE = 10  $\mu$ g/mL. Inserto: rango dinámico lineal de la curva de calibración. Cada punto representa el promedio de diez medidas replicadas.

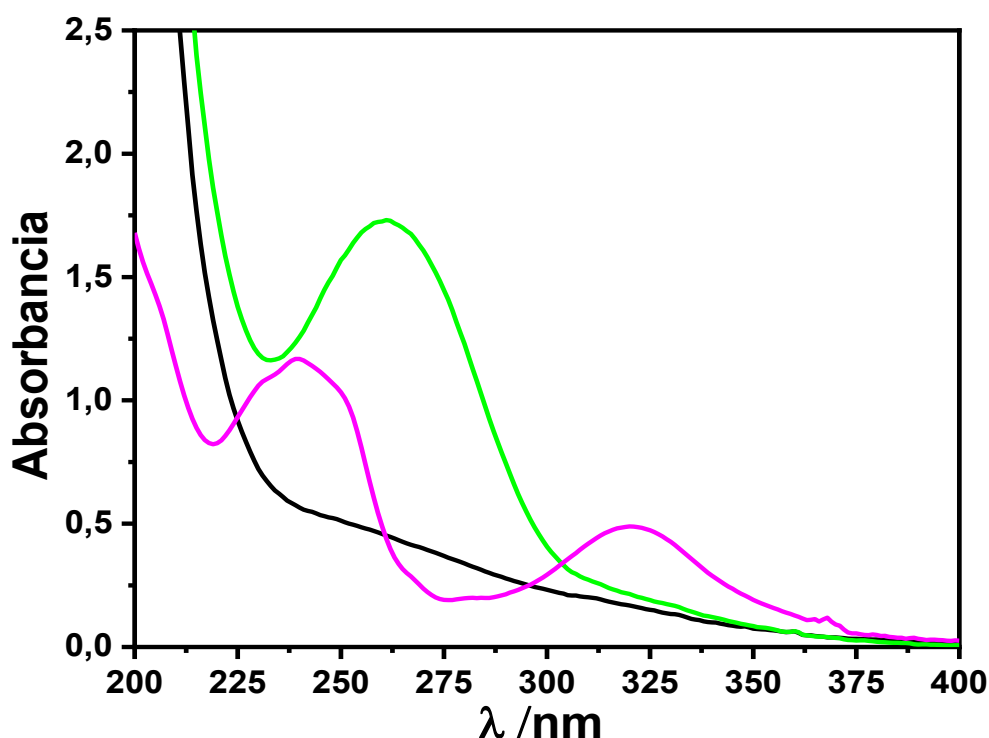
La curva de calibración de la Figura 99 es representada en escala logarítmica para la concentración, en donde se observa un decaimiento exponencial con el aumento de la concentración de STE, característico de un inmunoensayo competitivo. Los resultados concuerdan con una disminución de evento de la EQL por una disminución de bioconjugado CdSe@STE sobre el electrodo. Para bajas concentraciones de STE, la señal es alta debido a la mayor disponibilidad de sitios de unión en los anticuerpos

inmovilizados, lo que favorece la interacción del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con mayor cantidad del bioconjugado CdSe@STE.

No obstante, a concentraciones más elevadas de STE, la competencia con el bioconjugado por los sitios de unión reduce su fijación a los anticuerpos, disminuyendo la intensidad electroquimioluminiscente. El análisis cuantitativo sugiere un rango dinámico lineal entre  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-3}$  ng/mL con una alta sensibilidad en la detección de bajas concentraciones de STE, como se refleja en la caída pronunciada de la señal en la región lineal de la curva (inserto, Figura 99). A partir de la región lineal de la curva de calibración, se puede determinar el LD a partir de la prueba de hipótesis estadísticas<sup>347</sup>, en donde se consideran los errores de detección de concentración de STE en situaciones donde se asume que el ruido o la señal de fondo provienen principalmente de las fluctuaciones en la medición del blanco (es decir, la muestra sin analito). El LD se calculó siguiendo las recomendaciones actuales de la IUPAC, a partir de la ecuación (25), mientras que el LC se determinó a partir de la ecuación (27). Los valores obtenidos fueron  $1,77 \times 10^{-7}$  ng/mL y  $5,36 \times 10^{-6}$  ng/mL, respectivamente.

### **19.7. Detección de STE en matriz de maíz**

De acuerdo con los resultados que arrojó el inmunosensor para la detección de STE en soluciones patrón, se llevó a cabo la aplicación del inmunosensor para detectar STE en muestras de extracto de matriz de maíz con el fin de analizar el efecto de la matriz. Se utilizó una matriz de maíz estéril extraída a partir del método expuesto en la sección experimental. Para las determinaciones de STE en la matriz de maíz, se mantuvo el mismo rango de concentración de STE desde  $1 \times 10^{-6}$  ng/mL a 100 ng/mL. Previamente se realizaron mediciones de absorción UV-Vis para el extracto de maíz estéril y el extracto de maíz contaminado con 1,05 mg/mL de STE, las cuales se compararon con una solución patrón de STE con concentración 1,01 mg/mL. Las lecturas de absorbancia se muestran en la Figura 100.



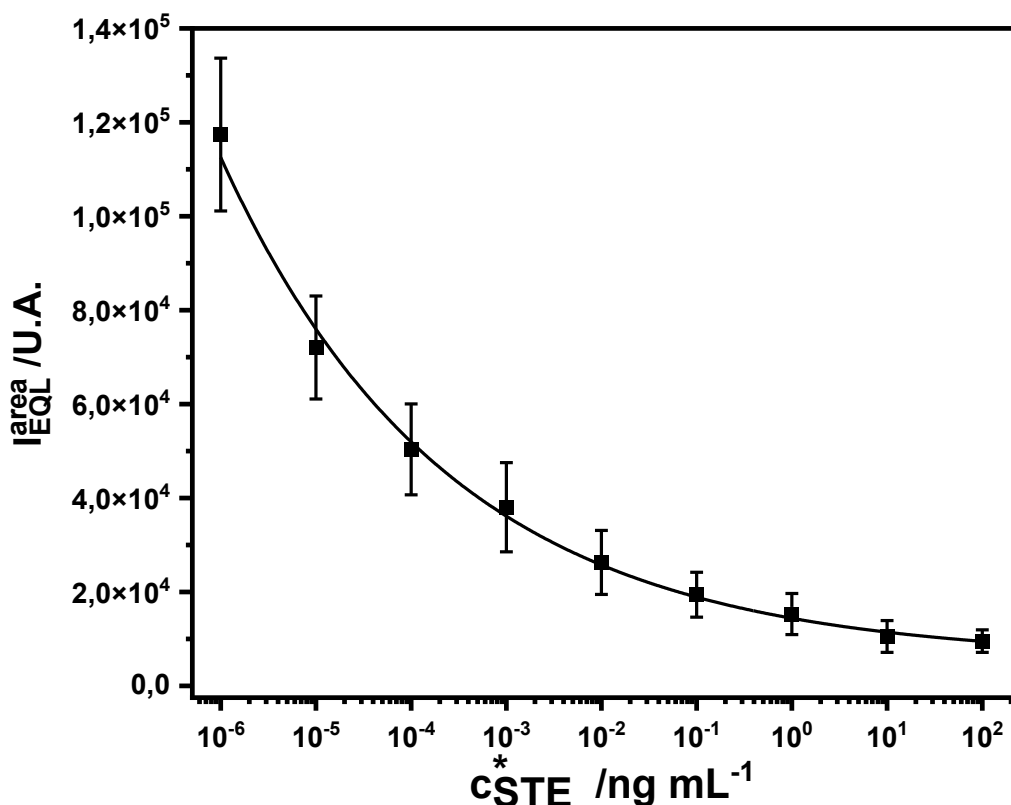
**Figura 100.** Espectros de absorción para el extracto de maíz estéril (—), solución patrón de STE 1,02 mg/mL (—) y extracto de maíz contaminada con 1,05 mg/mL de STE (—).

El corrimiento que se observa en la banda de absorción de la STE en el extracto de maíz contaminada con 1,05 mg/mL de STE (línea verde) a 261 nm, con respecto al patrón de STE (línea magenta), puede deberse a interacciones entre la STE y proteínas o polisacáridos presentes en el extracto del maíz, que pueden alterar el entorno electrónico de la molécula y modificar la posición de la banda de absorción, así como también a efectos de dispersión de la luz debido a efecto de matriz.

Posteriormente se realizó una curva de calibración empleando el inmunosensor electroquimioluminiscente para las distintas concentraciones de STE en el extracto de maíz, como se muestra en la Figura 101. Los resultados se obtuvieron siguiendo el protocolo de medición por la técnica on – off y la cuantificación de la emisión de EQL mediante la integración del área bajo la curva.

El comportamiento de la señal en relación con el aumento de la concentración de STE en las muestras de maíz sigue una tendencia similar a la observada en la curva de calibración en PBS, Sin embargo, cuando las concentraciones de STE superan los 0,01 ng/mL, los cambios en la intensidad de emisión fueron pequeños, mostrando un efecto matriz sobre

la respuesta. Por el contrario, en el rango de concentraciones de STE desde  $1 \times 10^{-6}$  ng/mL a  $1 \times 10^{-2}$  ng/mL, el inmunosensor responde adecuadamente a los cambios en la concentración de STE. La variación en la intensidad de EQL con la concentración es significativo, lo que indica que el inmunosensor es sensible para detectar pequeños cambios en la concentración de la micotoxina a cantidades bajas de STE en muestras reales.



**Figura 101.** Curva de calibración usando el inmunosensor electroquimioluminiscente a diferentes concentraciones de STE en una matriz de maíz 0,14 g/mL, en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE. La concentración de mAb-STE fue de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Cada punto representa el promedio de diez medidas replicadas.

De acuerdo con los resultados, la región en la que la emisión varía de manera lineal con la concentración de STE se encuentra en el intervalo desde  $1 \times 10^{-6}$  ng/mL a  $1 \times 10^{-3}$  ng/mL. Dentro de esta región, pequeñas variaciones en la concentración de STE generan grandes cambios en la emisión de EQL, lo que permite una detección sensible.

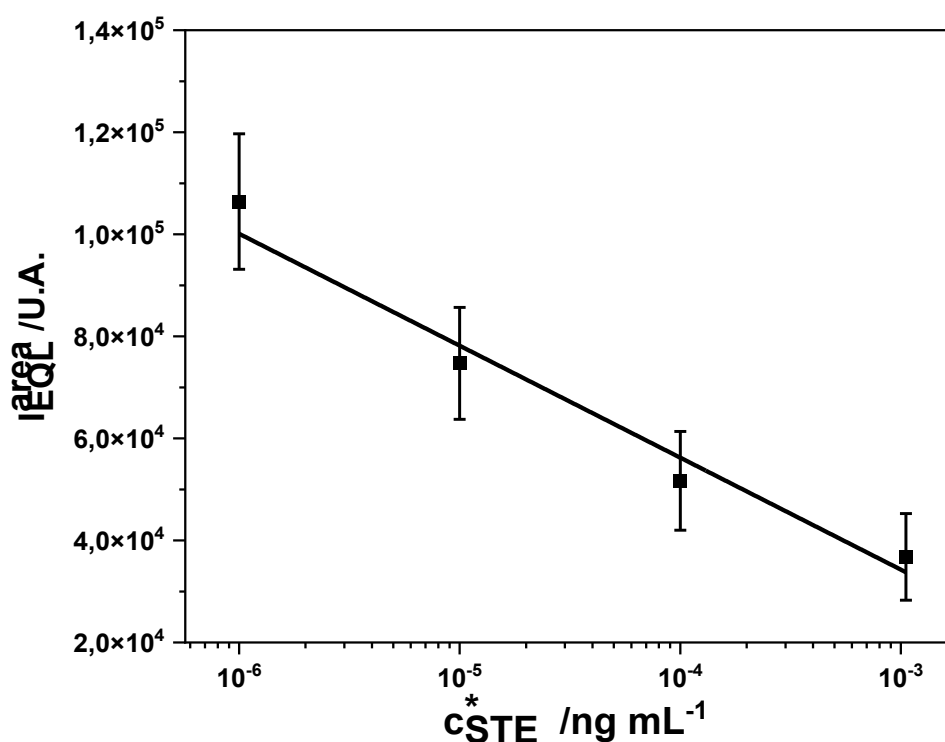
La Figura 102 ilustra la región lineal de la curva de calibración de la matriz de maíz, la cual se representa mediante la siguiente ecuación:

$$I_{EQL}^{Area} = -31554,65 U_{A_{EQL}} - 20143,42 \frac{U_{A_{EQL}}}{ng mL^{-1}} \times (c_{STE}^{*} ng mL^{-1}) \quad (76)$$

En sistemas con comportamiento lineal, la sensibilidad del sistema se define como el valor absoluto de la pendiente, lo que indica la variación de la señal por unidad de concentración de STE, es decir

$$S = \frac{\Delta I_{EQL}^{Area}}{\Delta c_{STE}^{*}} = -20143,42 \frac{U_{A_{EQL}}}{ng mL^{-1}} \quad (77)$$

Dado que la pendiente es elevada en valor absoluto, se puede concluir que el inmunosensor presenta una alta sensibilidad a la presencia de STE, lo que permite detectar incluso pequeñas variaciones en su concentración dentro del rango lineal establecido. Esta característica es fundamental para aplicaciones analíticas en muestras reales<sup>348</sup>.



**Figura 102.** Rango dinámico lineal de la curva de calibración construida para el extracto de granos de maíz mostrada en la Figura 101, a distintas concentraciones de STE.

Al igual que se realizó con la curva de calibración de STE en PBS, se calculó el LD y LC, ecuaciones 25 y 27, respectivamente, los que arrojaron valores de  $9,77 \times 10^{-7}$  ng/mL (equivalente a  $6,97 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) y  $2,96 \times 10^{-6}$  ng/mL, respectivamente, que son aproximadamente cinco veces superiores a los obtenidos en PBS.

#### 19.7.1. Comparación del inmunosensor de EQL con otros métodos de detección de STE

El LD estimado a partir del inmunosensor desarrollado para la detección de STE en matrices complejas de extracto de maíz es considerablemente menor a los determinados por diferentes autores, los que se encuentran reportados en la literatura. La Tabla 16 compara el rendimiento de este inmunosensor con algunos inmunosensores reportados en la literatura.

**Tabla 16.** Comparación de los límites de detección de STE reportados en estudios previos para distintas matrices, utilizando diferentes técnicas de detección analítica.

| Matriz de detección | LD                                                                             | Técnica analítica           | Ref.         |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| Maíz                | 0,80 ng/mL                                                                     | Inmunosensor Electroquímico | 349          |
| Leche               | 0,5 ng/mL                                                                      | Inmunosensor Fotoquímico    | 350          |
| Cerveza             | 0,03 $\mu\text{g/kg}$                                                          | HPLC                        | 351          |
| Trigo y maíz        | 3,8 – 7,6 ng/mL                                                                | ELISA indirecto             | 352          |
| trigo               | 1,5 ng/mL                                                                      | HPLC-MS/MS                  | 353          |
| Maíz                | 19 ng/mL                                                                       | Sensor fluorescente         | 354          |
| Maíz                | $9,77 \times 10^{-7}$ ng/mL<br>( $6,97 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/Kg}^{-1}$ ) | Electroquimioluminiscencia  | Este estudio |

La Tabla 16 presenta los LD de STE en distintas matrices mediante diversas técnicas analíticas. Se observa que los valores de LD varían significativamente en función de la técnica utilizada y la matriz de detección. Los métodos basados en inmunosensores (electroquímicos y fotoquímicos) presentan límites de detección bajos (0,80 ng/mL en maíz y 0,5 ng/mL en leche), lo que indica su alta sensibilidad. Por otro lado, el HPLC y el HPLC-MS/MS muestran LD más variables, con valores que oscilan entre 0,03  $\mu\text{g/kg}$  en cerveza y 1,5 ng/mL en trigo. La detección mediante sensores fluorescentes en maíz

resulta en un LD de 19 ng/mL, el más alto de la tabla, lo que sugiere menor sensibilidad en comparación con otras técnicas. En comparación con estos valores, el LD obtenido mediante el inmunosensor se encuentra dentro de los valores más bajos, lo que indica una alta sensibilidad del método y su potencial aplicabilidad en la detección de STE en maíz con un mejor desempeño.

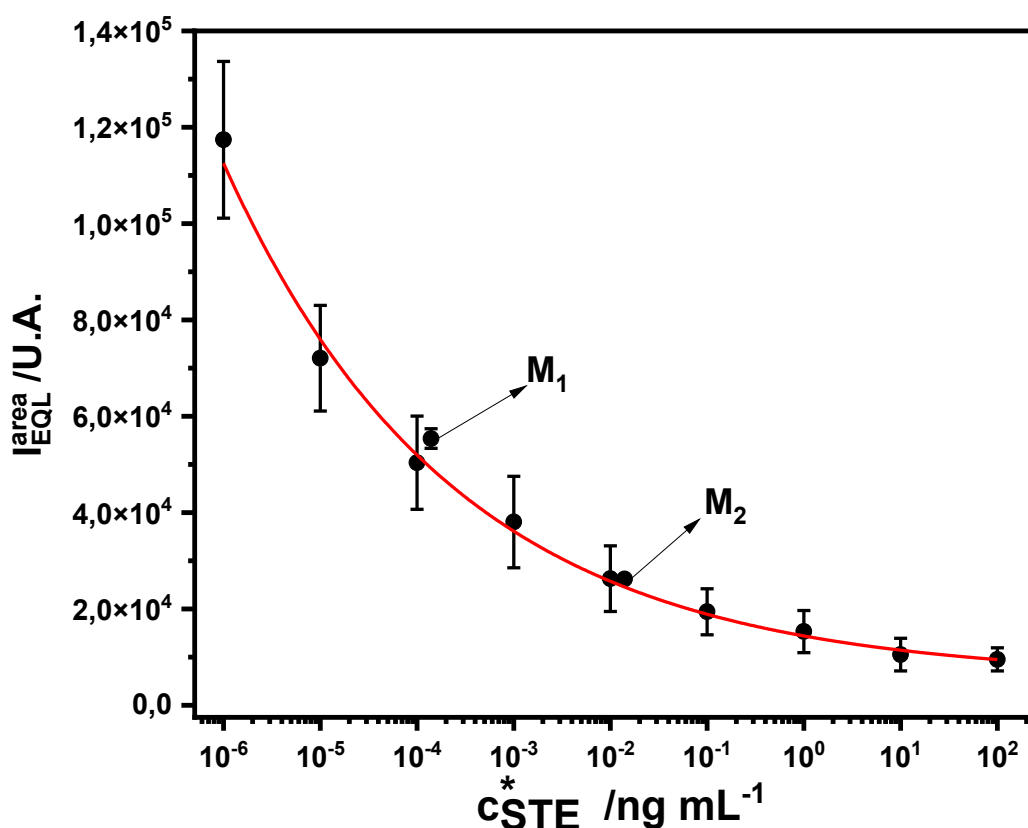
#### **19.7.2. Detección de STE en muestras reales de maíz**

Se realizó la detección de STE en dos muestras de granos de maíz contaminadas exprofeso utilizando el inmunosensor electroquimioluminiscente desarrollado. Para ello, se extrajo la matriz de cada muestra siguiendo el procedimiento previamente establecido. Las muestras fueron contaminadas en niveles de concentraciones de STE entre 1 µg/kg (muestra 1, M1) y 100 µg/kg (muestra 2, M2). Las mediciones de las concentraciones de STE en M1 y M2 se realizaron y se compararon teniendo en cuenta los niveles de la micotoxina legislados<sup>355</sup>, tanto en la República Argentina<sup>356,357</sup> como a nivel mundial. Según las referencias bibliográficas consultadas<sup>358,359</sup>, el límite máximo permitido de STE en muestras de maíz es de 20 µg de micotoxina por cada kilogramo de producto, basado en granos de maíz como materia prima (20 µg/kg). Teniendo en cuenta la concentración de extracto de granos de maíz (0,14 mg/mL), las concentraciones de STE en M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> fueron respectivamente 0,14 ng/mL y 14 ng/mL. Para ajustar las concentraciones al rango de la curva de calibración (Figura 101), las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> se diluyeron en un factor de 1000. Como resultado, las concentraciones obtenidas para M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> fueron de  $1 \times 10^{-4}$  ng/mL y  $1 \times 10^{-2}$  de STE, respectivamente. La Figura 103 muestra la curva de calibración construida para el inmunosensor incluyendo los valores de emisión obtenidos para las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>.

Se observó que los resultados obtenidos en las matrices de las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> se correlacionan al conjunto de calibración de STE. Para validar la eficiencia del método de detección de STE, se determina la concentración de STE en cada muestra aplicando el ajuste de calibración, y se calculan los porcentajes de recuperación para las concentraciones de  $1,4 \times 10^{-4}$  y  $1,4 \times 10^{-2}$  ng/mL, cuyos valores se presentan en la Tabla 17.

El inmunosensor desarrollado presenta una alta precisión, con coeficientes de variación (CV) inferiores al 5,1%, lo que indica baja dispersión en las mediciones. La capacidad de detectar STE en muestras reales es adecuada, con porcentajes de recuperación entre 86,5% y 99,3%, lo que sugiere una ligera subestimación de la concentración real, posiblemente debido a efectos de matriz que afectan la detección.

Además, el inmunosensor exhibe una excelente sensibilidad, detectando concentraciones de STE en el orden de  $1 \times 10^{-4}$  ng/mL, lo que permite identificar niveles muy por debajo del límite normativo de 20 µg/kg. Esto confirma que el método es confiable y adecuado para la detección de STE en muestras de maíz, asegurando su cumplimiento con la legislación vigente.



**Figura 103.** Curva de calibración para el inmunosensor electroquimioluminiscente incluyendo las respuestas obtenidas para las muestras  $M_1$  y  $M_2$ , en presencia de 25 ng/mL de CdSe@STE. La concentración de mAb-STE fue de 10 µg/mL.

**Tabla 17.** Resultados experimentales de la detección de STE en muestras maíz mediante la curva de calibración construida, comparados con las concentraciones de STE en matrices de maíz.

| $c_{STE}^*$<br>/ng mL <sup>-1</sup> | $I_{EQL}^{area}$<br>/U.A. | $c_{STE}^*$ determinada<br>/ng mL <sup>-1</sup> | %CV  | %R   |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|------|------|
| $1,4 \times 10^{-4}$                | 50386,40                  | $1,21 \times 10^{-4}$                           | 3,6  | 86,5 |
| $1,4 \times 10^{-2}$                | 24613,02                  | $1,37 \times 10^{-2}$                           | 3,09 | 98,3 |

### 19.7.3. Comparación del inmunosensor electroquimioluminiscente mediante HPLC

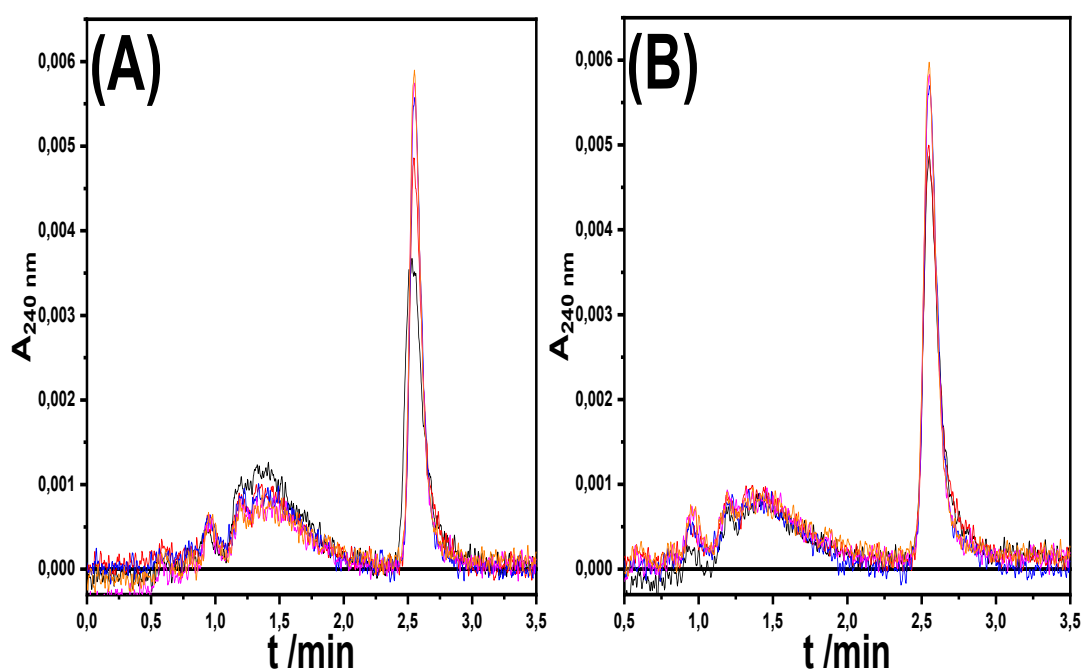
El rendimiento del inmunosensor electroquimioluminiscente desarrollado fue comparado con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en la detección de STE en extractos de maíz. Así, por HPLC, se determinaron las concentraciones de STE de las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>. La cuantificación de STE en cada muestra se realizó mediante el método de adición estándar. Para ello, se utilizaron 250 µL de cada matriz de maíz, con concentración de 0,14 g/mL. Cada volumen extraído se dividió en cinco alícuotas, con las cuales se prepararon soluciones con un volumen final de 500 µL, como se detalla en la Tabla 18.

Estas soluciones se obtuvieron añadiendo volúmenes específicos de una solución patrón de STE (12,2 µg/mL) y completando hasta el volumen final con la fase móvil utilizada (ACN + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en proporción 5:7), según lo descrito en la sección experimental.

Las medidas de HPLC se realizaron a partir de la lectura de absorbancia de cada solución a longitudes de onda de 245 nm y 325 nm, con un flujo de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 10 µg/mL, a partir de un régimen isocrático<sup>360</sup>. La Figura 104 muestra los cromatogramas obtenidos para las soluciones preparadas a diferentes concentraciones de STE, para las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>.

**Tabla 18.** Preparación de las soluciones para medición por HPLC de las matrices de maíz M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> contaminadas con una solución patrón de STE 12,2 µg/mL.

| Solución | Vol. de muestra (M <sub>1</sub> o M <sub>2</sub> ) /µL | Vol. patrón STE 12,2 µg/mL | Vol. Final / µL | c <sub>STE</sub> * ng/mL |
|----------|--------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------|
| A        | 50                                                     | 0                          | 500             | 0                        |
| B        | 50                                                     | 50                         | 500             | 1220                     |
| C        | 50                                                     | 100                        | 500             | 2440                     |
| D        | 50                                                     | 200                        | 500             | 4880                     |
| E        | 50                                                     | 300                        | 500             | 7320                     |



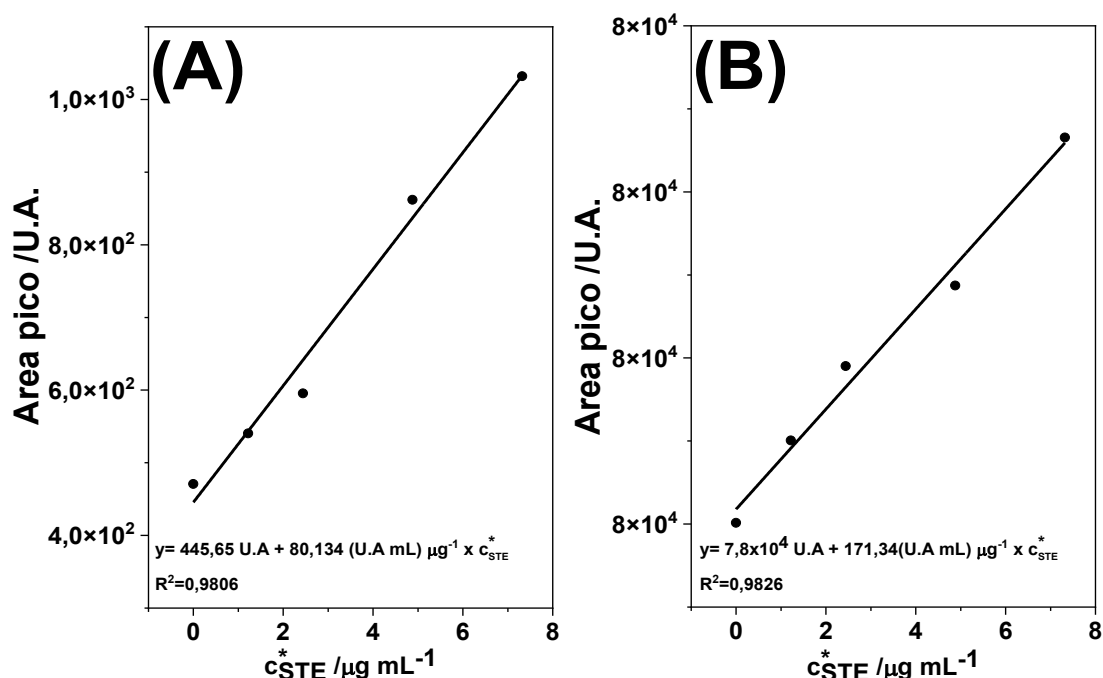
**Figura 104.** Cromatogramas de las muestras M<sub>1</sub> (A) y M<sub>2</sub> (B) en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ACN (7+5) para las concentraciones de las soluciones preparadas A (—), B (—), C (—), D (—) y E (—).

Los cromatogramas muestran un pico bien definido, con un tiempo de retención centrado en 2,55 min, el que se atribuye a la presencia de STE. Su valor de señal se incrementa con el aumento de la concentración de STE, lo que confirma su detección en la muestra<sup>361</sup>. Los picos previos son atribuidos a componentes de la matriz.

Se determinaron las áreas de pico de cada cromatograma de las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> y se construyeron las respectivas curvas de adición estándar por triplicado. La Figura 105 muestra los gráficos resultantes de los cuales, y teniendo en cuenta las diluciones hechas a partir del extracto de maíz, se pudo calcular la concentración de STE mediante la siguiente ecuación:

$$c_{STE}^{maiz} = \frac{\text{intercepto}}{m(\text{pendiente})} \times \frac{V_{\text{final sln}}}{V_{\text{muestra}}} \times \frac{V_{\text{total muestra}}}{V_{\text{extracto purificado}}} \times \frac{1}{V_{\text{total extracto}}} \quad (78)$$

donde el primero término de la ecuación hace referencia a las cifras de mérito determinadas a partir de cada curva de calibración,  $V_{\text{final sln}}$  es el volumen final de cada una de las muestras preparadas el cual fue de 500  $\mu\text{L}$ ,  $V_{\text{muestra}}$  es el volumen de muestra añadido a cada solución analizada el cual fue de 50  $\mu\text{L}$  para M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>,  $V_{\text{total muestra}}$  es el volumen utilizado en la medición HPLC a partir del volumen de extracto recolectado posterior a la purificación en la columna de fase sólida ( $V_{\text{extracto purificado}}$ ), los cuales corresponden a 250  $\mu\text{L}$  y 1095,23  $\mu\text{L}$  respectivamente. El último término de la ecuación corresponde al volumen en el cual fue diluido el extracto de maíz obtenido a partir de los 1,4 g de maíz tratados, el cual fue de 10 mL.



**Figura 105.** Curva de las adiciones estándar de STE para M<sub>1</sub> (A) y M<sub>2</sub> (B) en solución de ACN+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en proporción 5:7.

Para M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> la concentración determinada de STE fue de 0,176 ng/mL y 14,56 ng/mL respectivamente. La comparación entre los resultados del inmunosensor electroquimioluminiscente y de la detección HPLC se muestran en la Tabla 19. La determinación mediante HPLC arrojó sobreestimaciones de la concentración de STE en cada muestra de maíz. Los valores determinados fueron muy buenos.

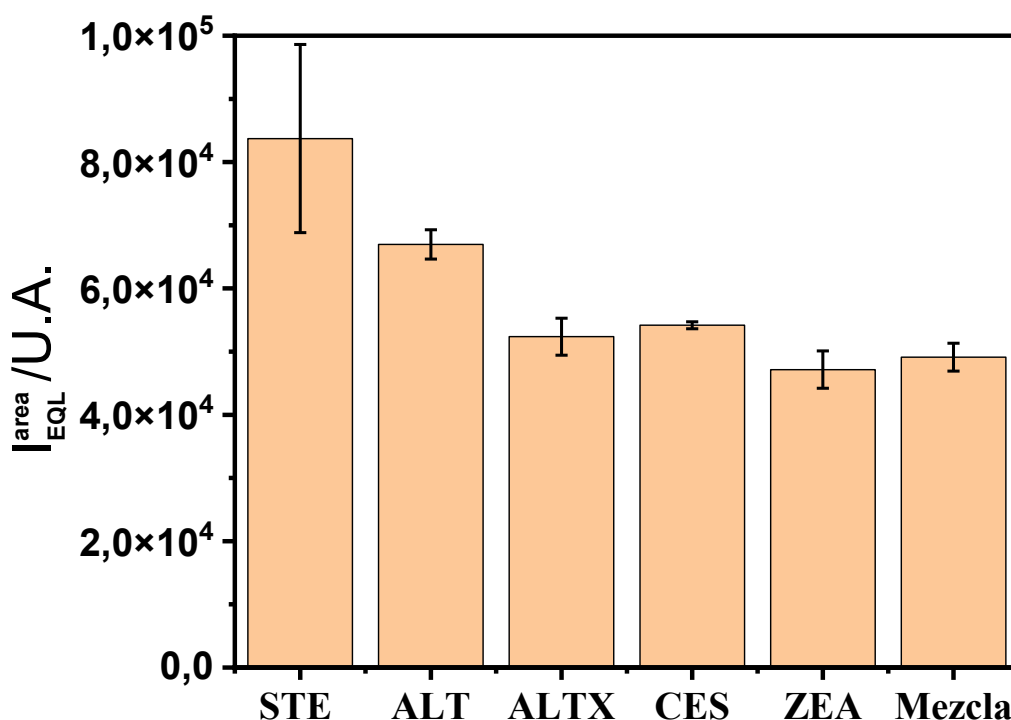
De esta manera, al comparar los resultados con los obtenidos por el inmunosensor electroquímico, se puede inferir el buen desempeño del inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de STE a distintas concentraciones en matrices complejas de maíz, además de ser un método práctico y con un alto límite de detección altamente sensible.

**Tabla 19.** Concentración de STE determinada mediante HPLC y el inmunosensor electroquimioluminiscente.

| Método de determinación | M <sub>1</sub>                         |       | M <sub>2</sub>                         |       |
|-------------------------|----------------------------------------|-------|----------------------------------------|-------|
|                         | c <sub>STE</sub> <sup>*</sup><br>ng/mL | % R   | c <sub>STE</sub> <sup>*</sup><br>ng/mL | % R   |
|                         | 0,14                                   | ----- | 14                                     | ----- |
| HPLC                    | 0,176                                  | 125,7 | 14,56                                  | 104   |
| Inmunosensor EQL        | 0,121                                  | 86,5  | 13,7                                   | 98,3  |

#### 19.7.4. Reactividad cruzada del inmunosensor electroquimioluminiscente

Se analizó la reactividad cruzada del inmunosensor electroquimioluminiscente frente a otras micotoxinas estructuralmente relacionadas, como zearalanona, altenueno, altertoxina, cercosporina y una mezcla de interferentes. La concentración de STE fue de 1×10 ng/mL y las concentraciones de micotoxinas fueron cien veces superiores. Los resultados se muestran en la Figura 106.

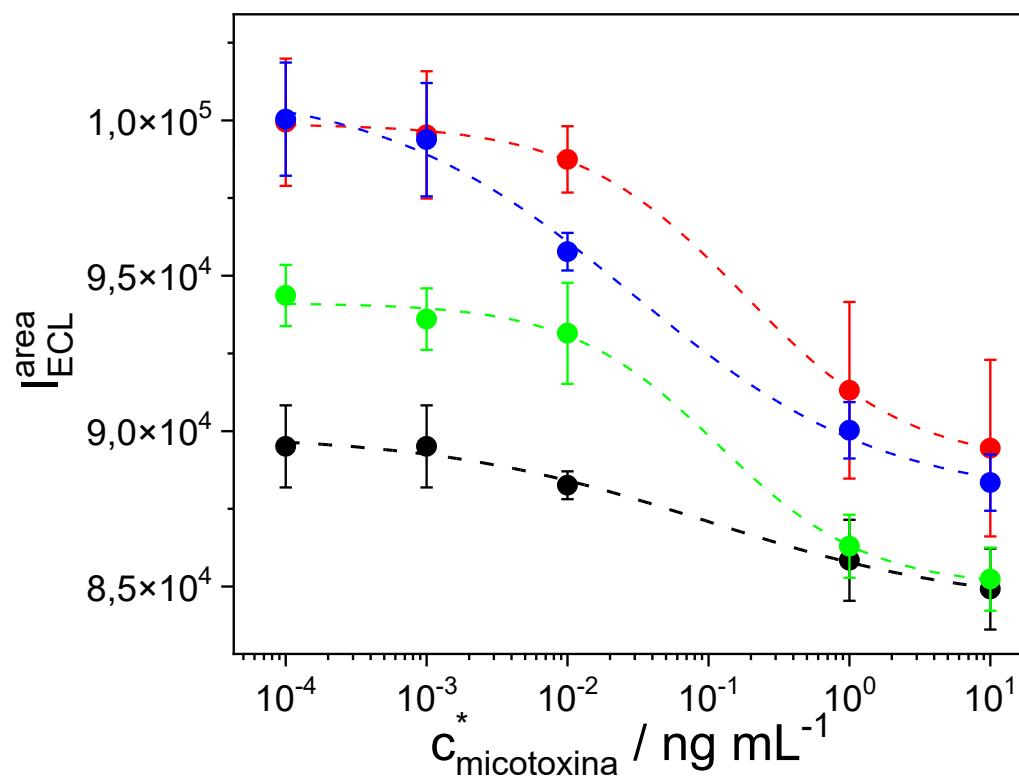


**Figura 106.** Reactividad cruzada del inmunosensor electroquimioluminiscente frente a micotoxinas estructuralmente relacionadas. La  $c_{STE}$  fue de  $1 \times 10^{-3}$  ng/mL, zearalanona, altenueno, altertoxina, cercosporina y una mezcla de estos (todos a  $1 \times 10^{-1}$  ng/mL). ZEA: zearalenona, ALT: altenueno, ATLX: altertoxina y CES: cercosporina.

Al analizar los transitorios de EQL de la Figura 106, se observó reactividad cruzada y una disminución de la señal  $I_{EQL}$  de entre el 19,88 % y el 41 %. Sin embargo, es improbable que todas las micotoxinas coexistan en la misma muestra con diferencias de concentración tan marcadas.

Teniendo en cuenta estudios previos a esta investigación, se ha demostrado que estas micotoxinas presentan similitud estructural con el epítipo de STE presente en el anillo hidroxilado del núcleo de bifurano. Para cada curva (Figura 107), la concentración correspondiente al punto medio de la curva, que corresponde a la concentración del analito que produce una inhibición del 50% de la señal (CI50), se utilizó para expresar la reactividad cruzada del ensayo según la ecuación:

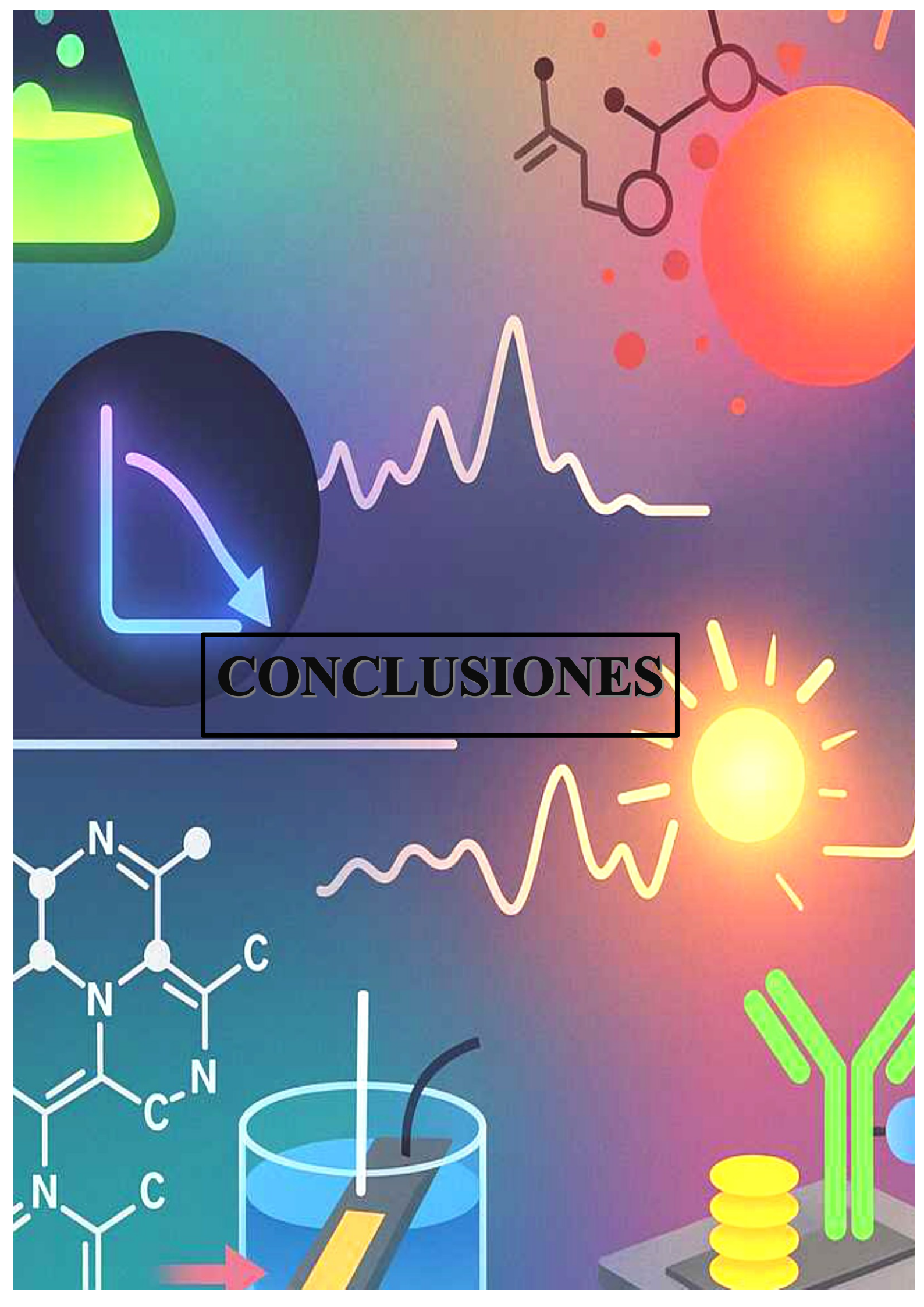
$$\% \text{ Reactividad cruzada} = 100 \times \frac{[IC_{50}(STE)]}{[IC_{50}(\text{compuesto de reacción cruzada})]} \quad (79)$$



**Figura 107.** Curvas de calibración para el análisis de la reactividad cruzada en el inmunosensor electroquimioluminiscente frente a micotoxinas estructuralmente relacionadas a esterigmatocistina. ZEA: zearalenona (•), ALT: altenueno (•), ATLX: altertoxina (•) y CES: cercosporina (•).

Los resultados obtenidos para  $IC_{50}$  de ATLX, ATL, CES y ZEA fueron 2,13; 2,05; 0,52 y 0,16 % de reactividad cruzada, lo que demuestra la excelente selectividad del inmunosensor electroquimioluminiscente.

El inmunosensor presenta un reconocimiento molecular altamente dirigido hacia los determinantes estructurales de la STE, asegurando una adecuada discriminación frente a compuestos interferentes y confirmando su especificidad para aplicaciones analíticas confiables. Aunque las micotoxinas evaluadas presentan similitudes estructurales con la STE, lo cual explica la reactividad cruzada observada, el inmunosensor demuestra una alta especificidad hacia la detección de STE frente a otras moléculas.



# CONCLUSIONES

## 20. Conclusiones

En esta Tesis Doctoral, se abordó un estudio multidisciplinar con el objetivo final de desarrollar herramientas analíticas, tales como sensores e inmunosensores electroquimioluminiscentes, para la detección de moléculas de bajo peso molecular, como lo es la micotoxina esterigmatocistina y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para ello, inicialmente, se realizaron estudios de síntesis y caracterización de nanomateriales con propiedades ópticas y electroquímicas. Se realizó la síntesis de QDs de CdSe a diferentes relaciones molares de los agentes de recubrimiento ácido 3-mercaptopropionico y ácido n-morfolino etanosulfónico (MPA/MES), teniendo como resultado nanocristales con tamaños variables inferiores a 5,0 nm con propiedades ópticas, electroquímicas y electroquimioluminiscentes definidas debido al confinamiento cuántico. Los QDs MPA/MES CdSe presentaron estabilidad y reproducibilidad en la respuesta de EQL, resultado que permitió su uso como marcadores electroquimioluminiscentes en el inmunosensor final. Se observó además que las síntesis elaboradas a partir de los precursores de cadmio y seleniuro respondieron positivamente al efecto de recubrimiento con los estabilizantes MPA y el MES, permitiendo así obtener QDs estables y solubles en agua. En cuanto a los resultados ópticos de los QDs con relaciones molares de estabilizante 30/70, 50/50, 100/0 y 150/0 MPA/MES, de los espectros de absorción, se pudo ver una banda correspondiente a la presencia de los QD MPA/MES CdSe en la solución, las cuales se observaron con máximos en longitudes de ondas comprendidas entre 350 nm y 460 nm. A partir de este resultado, se logró conocer la longitud de onda de mayor excitación de los QDs en solución, la cual se encontró alrededor de 450 nm. Los estudios de fluorescencia mostraron que, a mayor concentración de MES en la superficie del QD, la fluorescencia disminuye. Se observaron máximos de fluorescencia con valores entre 570 nm y 595 nm los cuales dependen directamente de la presencia en la superficie de recubrimiento del estabilizante MPA, esto se debe a que dicho compuesto promueve la formación de una superficie más compacta disminuyendo las transferencias electrónicas del núcleo del QD con el medio de solución. Asimismo, los rendimientos cuánticos de emisión de fluorescencia disminuyeron con el incremento de MES, desde el 5,2 a 3,1 %. Esta misma correlación se encontró con los tiempos de vida de fluorescencia, los que disminuyen desde 16,5 a 15 ns con el incremento de MES. Se infiere que la presencia de MES favorece la desactivación no radiativa del estado excitado. Los resultados calculados para los valores del  $E_g$ , determinados a partir de los resultados

ópticos permitieron lograr una aproximación del tamaño de los QDs de acuerdo con la teoría de confinamiento cuántico; los valores de  $E_g$  se encontraron en un rango desde 2,25 eV (para el caso del QD 30/70 MPA/MES CdSe) y 2,36 eV (para el QD 100/0 MPA/MES CdSe). Los resultados de valores de  $E_g$  mostraron que los mayores anchos de banda se encontraron cuando la concentración de MES era menor o ausente en la superficie de recubrimiento del QD, infiriendo que la presencia de MES en la síntesis incrementa el diámetro del nanocrystal.

Con relación a los estudios electroquímicos para cada una de las soluciones de estudio a distintos valores de pH, se logró deducir que, en medios más alcalinos, los potenciales de pico anódico y catódico fueron más definidos. En medio, los potenciales de pico de oxidación y reducción no fueron tan definidos ni presentaron altos valores de corrientes con relación a los valores obtenidos a pH alcalinos. La determinación de  $E_g$  a través de la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico reafirmó que la presencia del estabilizante MES en la superficie del QD disminuye el valor de  $E_g$ . Contrario a esto, la ausencia de dicho estabilizante arrojó un delta de pico de potenciales mayor; reafirmando las conclusiones observadas a partir de los datos espectroscópicos.

De los resultados de estudios de EQL en la región catódica, a diferencia de los resultados de fluorescencia, muestran que la emisión de los QD MPA/MES CdSe se ve favorecida con una mayor concentración del estabilizante MES en la superficie del capping del QD. A mayor concentración de MES, la reducción heterogénea de MPA/MES CdSe se desplaza desde -1,32 V a -1,10 V y la emisión electroquimioluminiscente resultó mayor cuando la relación molar MPA/MES fue de 30/70, disminuyendo con el incremento del estabilizante MPA.

En segunda instancia, se realizó la síntesis y caracterización de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, un nanomaterial con propiedades electroquímicas y fotoluminiscentes aprovechables para el diseño y aplicación de sistemas de detección basados en EQL. Este nanomaterial se conjugó con QDs MPA/MES CdSe con relaciones molares de 30/70, 50/50 y 100/0 MPA/MES, cuyo propósito consistió en desarrollar la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y analizar los posibles mecanismos de transferencia de energía tipo RET y mecanismos de transferencias de carga de huecos y electrones.

Se logró caracterizar mediante espectroscopia de absorción y emisión de fluorescencia el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. A manera general se pudo conocer que, mediante exfoliación química en medio ácido, el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> muestra propiedades ópticas y electroquímicas bien definidas, debido a la separación de las nanolaminas que mejora el flujo de los electrones en los niveles superficiales del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Los estudios espectroscópicos basados en la absorción y fluorescencia mostraron que hay una interacción entre ambas nanoestructuras cuando se sintetizó la heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, en donde se observó una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y un incremento en la intensidad de emisión fluorescente del QD MPA/MES CdSe, lo que permitió inferir la presencia de un mecanismo de transferencia energética tipo RET.

De los resultados electroquímicos y EQL se concluyó que la interacción entre ambos nanomateriales genera un aumento de la señal en la banda de emisión del QD MPA/MES CdSe en comparación a la señal de esta en ausencia de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Se pudo determinar que el proceso de transferencia de cargas entre un nanomaterial a otro es más eficiente en la región anódica debido a la oxidación eficiente y separación de los potenciales de oxidación de ambos nanomateriales presentes en la heteroestructura conjugada, por lo que a partir de esta conclusión se decidió realizar mediciones electroquimioluminiscentes en la región anódica. La intensidad de EQL se ve favorecida por la presencia de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> debido a la inyección de huecos desde el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hacia BV del QD MPA/MES CdSe, siendo el QDD la especie emisora, corroborado a partir de los espectros de EQL.

A partir de los estudios para la heteroestructura conjugada, se desarrolló un sensor electroquimioluminiscente basado en una sonda capaz de detectar bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicable a matrices biológicas como suero liofilizado reconstituido. La heteroestructura conjugada MPA/MES CdSe@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exhibió una reproducibilidad notable y una excelente sensibilidad para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por EQL, aplicable en sistemas acuosos y capaz de ser utilizada en matrices complejas, como suero, para estudios bioquímicos y aplicaciones en salud humana. El límite de detección determinado de  $1,81 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , el cual es significativamente menor que el de la mayoría de los sensores/biosensores reportados. Estos resultados permitieron la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en muestras de suero liofilizado reconstituido sin tratar, donde, a pesar del efecto matriz, se cuantificaron con éxito niveles sub- $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, el sensor

electroquimioluminiscente ha demostrado ser una herramienta analítica fiable para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en muestras complejas sin necesidad de pretratamiento.

Por último, se diseñó y ensambló un inmunosensor electroquimioluminiscente para la detección de la micotoxina STE en maíz. Se planteó un formato competitivo indirecto, el cual requirió la conjugación de STE con el QD MPA/MES CdSe. Así, se modificó la micotoxina en su forma hemiacetal, STE-OH, como paso previo para llevar a cabo la bioconjugación de la STE-OH con los QD MPA/MES CdSe. Para el ensamble del inmunosensor, se utilizó un electrodo ITO modificado con g- $\text{C}_3\text{N}_4$  sobre el cual se unió covalentemente el mAb-STE. La emisión electroquimioluminiscente fue debida a un proceso de transferencia de carga entre el g- $\text{C}_3\text{N}_4$  y los QD de CdSe, y fue sensible a los cambios de concentración de STE, mostrando un comportamiento típico de inmunoensayos competitivos. Se optimizaron todas las variables involucradas en el desarrollo del inmunosensor. De los resultados se pudo concluir que el inmunosensor diseñado es reproducible y sensible en la detección de STE en muestras de maíz, logrando un límite de detección de  $9,77 \times 10^{-7} \text{ ng/mL}$ . Los resultados obtenidos para la detección de STE en soluciones patrones y la muestra de extracto de maíz fueron comparables frente a detecciones de STE mediante HPLC, la cual confirmó la viabilidad y utilidad del inmunosensor desarrollado, para detectar STE a bajas concentraciones con una alta sensibilidad y porcentajes de recuperación mayores al 86%.

El inmunosensor electroquimioluminiscente desarrollado para la detección de STE se muestra entonces como una alternativa válida, sensible y practica aplicable a matrices complejas como el extracto de maíz, abriendo una puerta para el uso de la EQL como herramienta y técnica de detección de micotoxinas de interés global. Se espera que el inmunosensor sirva de base para futuras investigaciones para el control y detección de la micotoxina STE.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 21. Referencias bibliográficas

- 
- 1 Alvito, P., & Assunção, R. (2022). Climate Change and the Impact on Aflatoxin Contamination in Foods: Where Are We and What Should be Expected. In *Aflatoxins in Food: A Recent Perspective* (pp. 275-288). Cham: Springer International Publishing.
  - 2 Wu, Y. N., Liu, P., & Chen, J. S. (2018). Food safety risk assessment in China: Past, present and future. *Food Control*, 90, 212-221.
  - 3 Bennett, J., & Klich, M. A. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16 (3), 497–516. Article CAS.
  - 4 Cabañes, F. J., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., & Castellá, G. (2007). Mycotoxin-producing species. In *Mycotoxins in foods* (pp. 29-61).
  - 5 González-Techera, A., Zon, M. A., Molina, P. G., Fernández, H., González-Sapienza, G., & Arévalo, F. J. (2015). Development of a highly sensitive noncompetitive electrochemical immunosensor for the detection of atrazine by phage anti-immunocomplex assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 650-656.
  - 6 Yu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2012). 15 *Aspergillus flavus*. *OMICs Technologies: Tools for Food Science*, 367.
  - 7 Branch, K. R., Bennett, J. W., & Bhatnagar, D. (1993). Sterigmatocystin production by *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Reports*, 40(1), 20-21.
  - 8 Paterson, R.R.M. and Lima, N. (Eds.). (2015). *Molecular biology of foodborne and waterborne mycotoxigenic and fungal organisms*. CRC Press.
  - 9 Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J. Y., Stack, M., & Campbell, A. D. (1971). A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 54(1), 91-97.
  - 10 Senyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2011). Official methods and performance criteria for determining mycotoxins in food and feed. In *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed* (pp. 171-193). Woodhead Publishing.
  - 11 Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(7), 363-383.
  - 12 Chen, X., Tian, X., Shin, I., & Yoon, J. (2011). Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chemical Society Reviews*, 40(9), 4783-4804.

- 
- 13 Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical biochemistry*, 253(2), 162-168.
- 14 Gao, L., Fan, K., & Yan, X. (2020). Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical application. *Nanozymology: Connecting Biology and Nanotechnology*, 105-140.
- 15 Kozlov, A. V., & Osipov, A. N. (1990). A mechanism of luminol-dependent chemiluminescence of human serum in the presence of hydrogen peroxide. *Biofizika*, 35(2), 347-349.
- 16 Freitag R. (1996). *Biosensors in analytical biotechnology*. Texas: Landes Press.
- 17 Gilmartin, N. & O'Kennedy, R. (2012). Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzymatic and Microbial Technology*, 50(2), 87-95.
- 18 Castro, L., Luna, V., & Villalobos, R. (2007). State of the art and perspectives of the use of environmental biosensors in Mexico. *International Journal of Environmental Pollution*, 23(1), 35-45.
19. Makaraviciute, A., & Ramanaviciene, A. (2013). Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 460-471.
- 20 Goud, KY, Kailasa, SK, Kumar, V., Tsang, YF, Gobi, KV, & Kim, KH (2018). Progress in nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for mycotoxin detection: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 121, 205–222.
- 21 Lippa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosenors: principles and applications to clinical chemistry. *Clinical Chemical Acta*, 314 (1-2), 1-26.
- 22 Ghindilis, A. L., Atanasov, P., Wilkins, M., & Wilkins, E. (1998). Immunosenors: electrochemical detection and other engineering approaches. *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1), 113-131.
- 23 Muzyka, K. (2014). Current trends in the development of electrochemiluminescent immunosenors. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 393-407.
- 24 Miao, W. (2008). Electrogenated chemiluminescence and its biorelated applications. *Chemical Reviews*, 108(7), 2506-2553.
- 25 Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; 3rd ed.: J. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.

- 
- 26 Yan, C., Tang, F., Li, L., Li, H., Huang, X., Chen, D., & Ren, J. (2009). Synthesis of aqueous CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dots by a chemical aerosol flow method. *Nanoscale research letters*, 5(1), 189.
- 27 Ekimov, A. I., Efros, A. L., & Onushchenko, A. A. (1993). Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid state communications*, 88(11-12), 947-950.
- 28 Brus, L. E. (1984). Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *The Journal of chemical physics*, 80(9), 4403-4409.
- 29 Bruchez Jr, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., & Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *science*, 281(5385), 2013-2016.
- 30 Detection, N. (2016). Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive. *science*, 281(2016), 1998.
- 31 Atacan, K., & Özacar, M. (2021). Construction of a non-enzymatic electrochemical sensor based on CuO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> composite for selective detection of hydrogen peroxide. *Materials Chemistry and Physics*, 266, 124527.
- 32 Liu, Z., Wang, L., Liu, P., Zhao, K., Ye, S., & Liang, G. (2021). Rapid, ultrasensitive and non-enzyme electrochemiluminescence detection of hydrogen peroxide in food based on the ssDNA/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets hybrid. *Food Chemistry*, 357, 129753.
- 33 Majdoub, M., Sengottuvelu, D., Nouranian, S., & Al-Ostaz, A. (2024). Graphitic Carbon Nitride Quantum Dots (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> QDs): From Chemistry to Applications. *ChemSusChem*, e202301462.
- 34 Low, S. S., Chen, Z., Li, Y., Lu, Y., & Liu, Q. (2021). Design principle in biosensing: critical analysis based on graphitic carbon nitride (G-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) photoelectrochemical biosensor. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 145, 116454.
- 35 Chen, Y., & Bai, X. (2020). A review on quantum dots modified g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-based photocatalysts with improved photocatalytic activity. *Catalysts*, 10(1), 142.
- 36 Liu, Y., Ma, H., Zhang, Y., Pang, X., Fan, D., Wu, D., & Wei, Q. (2016). Visible light photoelectrochemical aptasensor for adenosine detection based on CdS/PPy/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 439-445.
- 37 Su, Y., Su, L., Liu, B., Lin, Y., & Tang, D. (2022). Self-powered photoelectrochemical assay for Hg<sup>2+</sup> detection based on g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-CdS-CuO composites and redox cycle signal amplification strategy. *Chemosensors*, 10(7), 286.

- 
- 38 Yu, P., Cui, J., Yang, J., Khan, M. U., Yang, L., Li, S., & Chen, Z. (2025). A novel aptamer-based photoelectrochemical sensor for zearalenone detection: Integration of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/BiOBr with in situ growth Ag<sub>2</sub>S quantum dots. *Bioelectrochemistry*, 162, 108853.
- 39 Yu, P., Cui, J., Yang, J., Khan, M. U., Yang, L., Li, S., & Chen, Z. (2025). A novel aptamer-based photoelectrochemical sensor for zearalenone detection: Integration of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/BiOBr with in situ growth Ag<sub>2</sub>S quantum dots. *Bioelectrochemistry*, 162, 108853.
- 40 Xu, L., Fang, G., Pan, M., Wang, X., & Wang, S. (2016). One-pot synthesis of carbon dots-embedded molecularly imprinted polymer for specific recognition of sterigmatocystin in grains. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 950-956.
- 41 Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica chimica acta*, 901, 12-33.
- 42 Vidal, J. C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J. R., Cubel, C., & Castillo, J. R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 146-158.
- 43 Kong, D., Xie, Z., Liu, L., Song, S., Kuang, H., Cui, G., & Xu, C. (2017). Development of indirect competitive ELISA and lateral flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. *Food and Agricultural Immunology*, 28(2), 260-273.
- 44 Biancardi, A., & Dall'Asta, C. (2015). Determination of sterigmatocystin in feed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(12), 2093-2100.
- 45 Khoshfetrat, S. M., Bagheri, H., & Mehrgardi, M. A. (2018). Visual electrochemiluminescence biosensing of aflatoxin M1 based on luminol-functionalized, silver nanoparticle-decorated graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 382-388.
- 46 Murugesan, A., Li, H., & Shoaib, M. (2025). Recent Advances in Functionalized Carbon Quantum Dots Integrated with Metal–Organic Frameworks: Emerging Platforms for Sensing and Food Safety Applications. *Foods*, 14(12), 2060.
- 47 Yacobi, B. G. (2003). *Semiconductor materials: an introduction to basic principles*. Springer Science & Business Media.
- 48 Hornyak, G. L., & Rao, A. K. (2016). Fundamentals of nanoscience (and nanotechnology). In *Nanoscience in dermatology* (pp. 15-29). Academic Press.

- 
- 49 Komarneni, S. (1992). Nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, 2(12), 1219-1230.
- 50 Afolalu, S. A., Soetan, S. B., Ongbali, S. O., Abioye, A. A., & Oni, A. S. (2019, November). Morphological characterization and physio-chemical properties of nanoparticle-review. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 640, No. 1, p. 012065). IOP Publishing.
- 51 Chen, Y., Fan, Z., Zhang, Z., Niu, W., Li, C., Yang, N., & Zhang, H. (2018). Two-dimensional metal nanomaterials: synthesis, properties, and applications. *Chemical reviews*, 118(13), 6409-6455.
- 52 Zhang, H., Chhowalla, M., & Liu, Z. (2018). 2D nanomaterials: graphene and transition metal dichalcogenides. *Chemical Society Reviews*, 47(9), 3015-3017.
- 53 Thostenson, E. T., Li, C., & Chou, T. W. (2005). Nanocomposites in context. *Composites science and technology*, 65(3-4), 491-516.
- 54 Smith, A. M., & Nie, S. (2010). Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Accounts of chemical research*, 43(2), 190-200.
- 55 Chen, G., Seo, J., Yang, C., & Prasad, P. N. (2013). Nanochemistry and nanomaterials for photovoltaics. *Chemical Society Reviews*, 42(21), 8304-8338.
- 56 Fondell, M., Jacobsson, T. J., Boman, M., & Edvinsson, T. (2014). Optical quantum confinement in low dimensional hematite. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(10), 3352-3363.
- 57 Lathe, A., & Palve, A. M. Types and properties of semiconductors. In *Handbook of Semiconductors* (pp. 26-39). CRC Press.
- 58 Balkan, N., Erol, A., Balkan, N., & Erol, A. (2021). Intrinsic and Extrinsic Semiconductors. *Semiconductors for Optoelectronics: Basics and Applications*, 37-78.
- 59 Inkson, J. C. (1976). The effect of electron interaction on the band gap of extrinsic semiconductors. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 9(7), 1177.
- 60 Wang, Z., Nayak, P. K., Caraveo-Frescas, J. A., & Alshareef, H. N. (2016). Recent developments in p-Type oxide semiconductor materials and devices. *Advanced Materials*, 28(20), 3831-3892.
- 61 Shim, M., & Guyot-Sionnest, P. (2000). N-type colloidal semiconductor nanocrystals. *Nature*, 407(6807), 981-983.
- 62 Nethercot Jr, A. H. (1974). Prediction of Fermi energies and photoelectric thresholds based on electronegativity concepts. *Physical Review Letters*, 33(18), 1088.

- 
- 63 Nirmal, M., Norris, D. J., Kuno, M., Bawendi, M. G., Efros, A. L., & Rosen, M. (1995). Observation of the "dark exciton" in CdSe quantum dots. *Physical Review Letters*, 75 (20), 3728.
- 64 Brus, L. (1986). Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory. *The Journal of Physical Chemistry*, 90 (12), 2555-2560.
- 65 Elizarraras, A. L. D., Martínez, J. M. R., & Salazar, D. E. (2020). Synthesis and characterization of perovskite quantum dots. *University Memory*, 2(2).
- 66 Coe, S., Woo, W.K., Bawendi, M., & Bulović, V. (2002). Electroluminescence of single monolayers of nanocrystals in organic molecular devices. *Nature*, 420(6917), 800–803.
- 67 González, A. (2002). Energy spectrum, level density, spin polarization, transport and optical properties in quantum dots and atom traps. *arXiv preprint cond-mat/0305265*.
- 68 Pankov, J. I. (1971). *Optical Processes in Semiconductors* (Dover, New York, 1971, 1975).
- 69 Lüker, S., & Reiter, D. E. (2019). A review on optical excitation of semiconductor quantum dots under the influence of phonons. *Semiconductor Science and Technology*, 34(6), 063002.
- 70 Singleton, J. (2001). *Band theory and electronic properties of solids* (Vol. 2). Oxford University Press.
- 71 Klimov, V. I. (2000). Optical nonlinearities and ultrafast carrier dynamics in semiconductor nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104 (26), 6112-6123.
- 72 Reiss, P., Bleuse, J., and Pron, A. (2002). Highly luminescent low-dispersion CdSe/ZnSe core/shell nanocrystals. *Nanoletters*, 2 (7), 781-784.
- 73 Murphy, CJ and Coffey, JL (2002). Quantum dots: a primer. *Applied Spectroscopy*, 56 (1), 16A-27A.
- 74 Weng, J. and Ren, J. (2006). Luminescent quantum dots: a very attractive and promising tool in biomedicine. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (8), 897-909.
- 75 Reiss, P., Protiere, M., and Li, L. (2009). Core/shell semiconductor nanocrystals. *Small*, 5 (2), 154–168.
- 76 Bowers II M. J., McBride J. R. and Rosenthal S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 15378.
- 77 Fueyo González, F. J. (2019). New fluorophores with application in the development of fluorescent protein biosensors.

- 
- 78 Sun, S. and Murray, C.B. (1999). Synthesis of monodisperse cobalt nanocrystals and their assembly into magnetic superlattices. *Journal of Applied Physics*, 85 (8), 4325–4330.
- 79 García de Arquer, F. P., Talapin, D. V., Klimov, V. I., Arakawa, Y., Bayer, M., & Sargent, E. H. (2021). Semiconductor quantum dots: Technological progress and future challenges. *Science*, 373(6555), eaaz8541.
- 80 Gilmartin, N. & O'Kennedy, R. (2012). Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzymatic and Microbial Technology*, 50(2), 87-95.
- 81 Castro, L., Luna, V., & Villalobos, R. (2007). State of the art and perspectives of the use of environmental biosensors in Mexico. *International Journal of Environmental Pollution*, 23(1), 35-45.
- 82 Lizarazo, C., González, E., Arias, C., & Guarguati, J. (2018). Nanomaterials: an approach to the basics. *Medicine and Occupational Safety*, 64(251), 109-118.
- 83 Wen, P., Lei, Y., Li, W., & Fan, M. (2020). Two-dimension layered nanomaterial as lubricant additives: Covalent organic frameworks beyond oxide graphene and reduced oxide graphene. *Tribology International*, 143, 106051.
- 84 Li, X., Zhang, X., Ma, H., Wu, D., Zhang, Y., Du, B., & Wei, Q. (2014). Cathodic electrochemiluminescence immunosensor based on semiconductor carboxylated g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocomposites and graphene for the ultrasensitive detection of squamous cell carcinoma antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 330-336.
- 85 Teter, DM and Hemley, RJ (1996). Low compressibility carbon nitrides. *Science*, 271 (5245), 53-55.
- 86 Dong, F., Wu, L., Sun, Y., Fu, M., Wu, Z., & Lee, S. C. (2011). Efficient synthesis of polymeric gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> layered materials as novel efficient visible light driven photocatalysts. *Journal of Materials Chemistry*, 21(39), 15171-15174.
- 87 Zhang, S., Gao, H., Huang, Y., Wang, X., Hayat, T., Li, J., & Wang, X. (2018). Ultrathin gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets coupled with amorphous Cu-doped FeOOH nanoclusters as 2D/0D heterogeneous catalysts for water remediation. *Environmental Science: Nano*, 5(5), 1179-1190.
- 88 Zhang, S., Gao, H., Huang, Y., Wang, X., Hayat, T., Li, J., & Wang, X. (2018). Ultrathin gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets coupled with amorphous Cu-doped FeOOH nanoclusters as 2D/0D heterogeneous catalysts for water remediation. *Environmental Science: Nano*, 5(5), 1179-1190.

- 
- 89 Takanabe, K., Kamata, K., Wang, X., Antonietti, M., Kubota, J., & Domen, K. (2010). Photocatalytic hydrogen evolution on dye-sensitized mesoporous carbon nitride photocatalyst with magnesium phthalocyanine. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 13020-13025.
- 90 Yang, L., Liu, X., Liu, Z., Wang, C., Liu, G., Li, Q., & Feng, X. (2018). Enhanced photocatalytic activity of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 2D nanosheets through thermal exfoliation using dicyandiamide as precursor. *Ceramics International*, 44(17), 20613-20619.
- 91 Yan, S. C., Li, Z. S., & Zou, Z. G. (2009). Photodegradation performance of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> fabricated by directly heating melamine. *Langmuir*, 25(17), 10397-10401.
- 92 Xiong, M., Rong, Q., Meng, H. M., & Zhang, X. B. (2017). Two-dimensional graphitic carbon nitride nanosheets for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 212-223.
- 93 Majdoub, M., Anfar, Z., & Amedlous, A. (2020). Emerging chemical functionalization of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: covalent/noncovalent modifications and applications. *ACS nano*, 14(10), 12390-12469.
- 94 Yang, D., Wang, W., Zhao, X., Zhou, Z., Ren, H., Chen, Y., & Jiang, Z. (2020). Synthesis of high-efficient g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/polydopamine/CdS nanophotocatalyst based on bioinspired adhesion and chelation. *Materials Research Bulletin*, 131, 110970.
- 95 Ong, W. J., Tan, L. L., Chai, S. P., Yong, S. T., & Mohamed, A. R. (2015). Surface charge modification via protonation of graphitic carbon nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) for electrostatic self-assembly construction of 2D/2D reduced graphene oxide (rGO)/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanostructures toward enhanced photocatalytic reduction of carbon dioxide to methane. *Nano Energy*, 13, 757-770.
- 96 Tian, K., Liu, H., Dong, Y., Chu, X., & Wang, S. (2019). Amperometric detection of glucose based on immobilizing glucose oxidase on g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 581, 123808.
- 97 Fischer, M. J. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Surface plasmon resonance: methods and protocols*, 55-73.
- 98 Zhou, Z., Zhang, Y., Shen, Y., Liu, S., & Zhang, Y. (2018). Molecular engineering of polymeric carbon nitride: advancing applications from photocatalysis to biosensing and more. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2298-2321.
- 99 Devthade, V., Kamble, G., Ghugal, S. G., Chikhaliya, K. H., & Umare, S. S. (2018). Visible light-driven Biginelli reaction over Mesoporous g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Lewis-base catalyst. *Chemistry Select*, 3(14), 4009-4014.

- 
- 100 Wang, X. L., Fang, W. Q., Liu, W., Jia, Y., Jing, D., Wang, Y., & Yao, X. (2017). Brønsted base site engineering of graphitic carbon nitride for enhanced photocatalytic activity. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(36), 19227-19236.
- 101 Liu, Y. N., Shen, C. C., Jiang, N., Zhao, Z. W., Zhou, X., Zhao, S. J., & Xu, A. W. (2017). g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hydrogen-bonding viologen for significantly enhanced visible-light photocatalytic H<sub>2</sub> evolution. *ACS Catalysis*, 7(12), 8228-8234
- 102 Zhang, Q., Wang, C. F., Ling, L. T., & Chen, S. (2014). Fluorescent nanomaterial-derived white light-emitting diodes: what's going on. *Journal of Materials Chemistry C*, 2(22), 4358-4373.
- 103 Armstrong, N. R., Wightman, R. M., & Gross, E. M. (2001). Light-emitting electrochemical processes. *Annual Review of Physical Chemistry*, 52(1), 391-422.
- 104 Walash, M.I., Belal, F., El-Enany, N., and El-Maghrabey, M.H. (2011). A simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of pregabalin in capsules by fluorescamine derivatization. *Luminescence*, 26 (5), 342–348.
- 105 Knight, A. W. (1999). A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 (1), 47-62.
- 106 Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principles of instrumental analysis* (Vol. 5, pp. 614-633). Madrid: McGraw-Hill.
- 107 Sánchez, M. M., Navarrete, J., & Salgado, G. (2004). Electrochemiluminescence of luminol using low-cost electrodes. *Annals of Chemistry of the RSEQ*, (2), 51-54.
- 108 Agbaria, R. A., Oldham, P. B., McCarroll, M., McGown, L. B., & Warner, I. M. (2002). Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74 (16), 3952-3962.
- 109 Chen, X. M, Su, B. Y, Song, X. H, Chen, Q. A, Chen, X., & Wang, X. R (2011). Recent advances in electrochemiluminescent enzyme biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (5), 665-676.
- 110 Knight, A. W., & Greenway, G. M. (1996). Relationship between structural attributes and observed electrogenerated chemiluminescence (ECL) activity of tertiary amines as potential analytes for the tris(2,2-bipyridine) ruthenium (II) ECL reaction. A review. *Analyst*, 121 (11), 101R-106R.
- 111 Schaadt, D. M., Feng, B., & Yu, E. T. (2005). Enhanced semiconductor optical absorption via surface plasmon excitation in metal nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 86(6).

- 
- 112 Zhao, Y., Lim, M., Choi, S., & Yu, J. (2022). Excitation spectrum, nanoparticles, and their applications in cellular optical imaging. *Journal of Biological Education*, 56(2), 122-129.
- 113 Qi, H., & Zhang, C. (2022). Organic nanoparticles for electrogenerated chemiluminescence assay. *Current Opinion in Electrochemistry*, 34, 101023.
- 114 Turro, N. J., Ramamurthy, V., & Scaiano, J. C. (2009). Principles of molecular photochemistry: an introduction. University science books.
- 115 Wang, G., Baker-Murray, A. A., & Blau, W. J. (2019). Saturable absorption in 2D nanomaterials and related photonic devices. *Laser & Photonics Reviews*, 13(7), 1800282.
- 116 Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G., & Anderson, H. L. (2009). Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(18), 3244-3266.
- 117 Hamilton, J. (Ed.). (2012). Internal conversion processes. Elsevier.
- 118 Di Maiolo, F., & Painelli, A. (2018). Intermolecular energy transfer in real time. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(10), 5339-5349.
- 119 Hao, E., Anderson, N. A., Asbury, J. B., & Lian, T. (2002). Effect of trap states on interfacial electron transfer between molecular absorbates and semiconductor nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(39), 10191-10198.
- 120 Spreinat, A., Dohmen, M. M., Lüttgens, J., Herrmann, N., Klepzig, L. F., Nißler, R., & Kruss, S. (2021). Quantum defects in fluorescent carbon nanotubes for sensing and mechanistic studies. *The Journal of Physical Chemistry C*, 125(33), 18341-18351.
- 121 Rivera-Álvarez, A., Quesada, A., Jose-Roberto, V. B., & Paniagua, S. A. (2022). Síntesis, propiedades y aplicaciones de puntos cuánticos a base de carbono.
- 122 Demchenko, A. P., & Dekaliuk, M. O. (2013). Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging. *Methods and applications in fluorescence*, 1(4), 042001.
- 123 Dulkeith, E., Morteani, A. C., Niedereichholz, T., Klar, T. A., Feldmann, J., Levi, S. A., & Gittins, D. I. (2002). Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: format Radiative and Nonradiative Effects. *Physical review letters*, 89(20), 203002.
- 124 Sims, C. M., Hanna, S. K., Heller, D. A., Horoszkó, C. P., Johnson, M. E., Bustos, A. R. M., & Nelson, B. C. (2017). Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale*, 9(40), 15226-15251.

- 
- 125 Parveen, S., Aslam, M. S., Hu, L., & Xu, G. (2013). Electrogenated chemiluminescence: protocols and applications (pp. 1-152). New York, NY, USA: Springer.
- 126 Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Boston, MA: springer US.
- 127 Pons, T., Medintz, I. L., Sapsford, K. E., Higashiya, S., Grimes, A. F., English, D. S., & Mattoussi, H. (2007). On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. *Nano letters*, 7(10), 3157-3164.
- 128 Huang, B., Zhou, X., Xue, Z., & Lu, X. (2013). Electrochemiluminescence quenching of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 51, 107-116.
- 129 Bhatt, K., Tan, S., Karumuri, S., & Kalkan, A. K. (2010). Charge-selective Raman scattering and fluorescence quenching by "nanometal on semiconductor" substrates. *Nano letters*, 10(10), 3880-3887.
- 130 Cheng, P. P. H., Silvester, D., Wang, G., Kalyuzhny, G., Douglas, A., & Murray, R. W. (2006). Dynamic and static quenching of fluorescence by 1– 4 nm diameter gold monolayer-protected clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(10), 4637-4644.
- 131 Olley, D. A., Wren, E. J., Vamvounis, G., Fernee, M. J., Wang, X., Burn, P. L., & Shaw, P. E. (2011). Explosive sensing with fluorescent dendrimers: the role of collisional quenching. *Chemistry of Materials*, 23(3), 789-794.
- 132 Keizer, J. (1983). Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *Journal of the American Chemical Society*, 105(6), 1494-1498.
- 133 Huang, B., Zhou, X., Xue, Z., & Lu, X. (2013). Electrochemiluminescence quenching of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 51, 107-116.
- 134 McCall, J., Alexander, C., & Richter, M. M. (1999). Quenching of electrogenerated chemiluminescence by phenols, hydroquinones, catechols, and benzoquinones. *Analytical chemistry*, 71(13), 2523-2527.
- 135 Xu, Y., Zhang, L., Liu, Y., Jin, Z., Zhao, Q., Yang, F., & Xiao, D. (2016). Sensitive and selective determination of GSH based on the ECL quenching of Ru (II) 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione complex. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 182-187.
- 136 Liu, X., Jiang, H., Lei, J., & Ju, H. (2007). Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Analytical Chemistry*, 79(21), 8055-8060.

- 
- 137 Jones, G.A. & Bradshaw, D.S. (2019). Resonance energy transfer: from fundamental theory to recent applications. *Frontiers in Physics*, 7, 100.
- 138 Andrews, DL, Curutchet, C. & Scholes, GD (2011). Resonance energy transfer: beyond the limits. *Laser and Photonics Reviews*, 5(1), 114-123.
- 139 Zoski, C. G. (Ed.). (2006). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.
- 140 Girault, HH (2007). *Physical and analytical electrochemistry*. EPFL Press.
- 141 Sears, F. W. (1963). Faraday's law and Ampere's law. *American Journal of Physics*, 31(6), 439-443.
- 142 Arevalo, A., & Pastor, G. (1985). Verification of the Nernst equation and determination of a standard electrode potential. *Journal of Chemical Education*, 62(10), 882.
- 143 Sterratt, D. C. (2022). Nernst Equation. In *Encyclopedia of Computational Neuroscience* (pp. 2181-2182). New York, NY: Springer New York.
- 144 Chen, L. Q. (2019). Chemical potential and Gibbs free energy. *Mrs Bulletin*, 44(7), 520-523.
- 145 Oldham, P. B., McCarroll, M. E, McGown, L. B, & Warner, I. M. (2000). Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72 (12), 197-210.
- 146 Deng, S., Lei, J., Huang, Y., Cheng, Y., & Ju, H. (2013). Electrochemiluminescent quenching of quantum dots for ultrasensitive immunoassay by nitrogen doped graphene supported hemin catalyzed oxygen reduction. *Analytical Chemistry*, 85 (11), 5390-5396.
- 147 Omer, K. M, Kanibolotsky, A. L, Skabara, P. J, Perepichka, I. F, & Bard, A. J (2007). Electrochemistry, spectroscopy and electrogenerated chemiluminescence of some star-shaped truxene-oligofluorene compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111 (24), 6612-6619.
- 148 Marcus, R. A. (2020). Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. In *Protein electron transfer* (pp. 249-272). Garland Science.
- 149 Saveant, J. M., & Vianello, E. (1965). Potential scanning chronoamperometry: Kinetic currents for first order chemical reactions parallel to the electron transfer process (catalytic currents). *Electrochimica Acta*, 10 (9), 905-920.
- 150 Yamada, A., Kato, Y., Yoshikuni, T., Tanaka, Y., & Tanaka, N. (1979). Computer aided measurement of ion diffusion coefficients by using the Cottrell equation. *Analytica Chimica Acta*, 112 (1), 55-63.

- 
- 151 Macero, D. J. and Rulfs, C. L. (1959). Calibrated Cottrell diffusion measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 81(12), 2942-2944
- 152 Bard, A. J. (Ed.). (2004). *Electrogenerated chemiluminescence*. CrC Press.
- 153 Richter, M. M. (2004). Electrochemiluminescence (ecl). *Chemical Reviews*, 104(6), 3003-3036.
- 154 Leland, J. K., & Powell, M. J. (1990). Electrogenerated chemiluminescence: an oxidative-reduction type ECL reaction sequence using tripropyl amine. *Journal of the Electrochemical Society*, 137(10), 3127.
- 155 Poznyak, S. K., Talapin, D. V., Shevchenko, E. V., & Weller, H. (2004). Quantum dot chemiluminescence. *Nano Letters*, 4(4), 693-698.
- 156 Liu, X., & Ju, H. (2008). Coreactant enhanced anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots at low potential for sensitive biosensing amplified by enzymatic cycle. *Analytical chemistry*, 80(14), 5377-5382.
- 157 Ding, Z., Quinn, B. M., Haram, S. K., Pell, L. E., Korgel, B. A., & Bard, A. J. (2002). Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence from silicon nanocrystal quantum dots. *Science*, 296(5571), 1293-1297.
- 158 Wang, X. F., Zhou, Y., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2009). Signal-on electrochemiluminescence biosensors based on cds-carbon nanotube nanocomposite for the sensitive detection of choline and acetylcholine. *Advanced Functional Materials*, 19(9), 1444-1450.
- 159 Deng, L., Shan, Y., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2012). Electrochemiluminescence behaviors of Eu 3+-doped CdS nanocrystals film in aqueous solution. *Nanoscale*, 4(3), 831-836.
- 160 Mei, Y. L., Wang, H. S., Li, Y. F., Pan, Z. Y., & Jia, W. L. (2010). Electrochemiluminescence of CdTe/CdS quantum dots with tripropylamine as coreactant in aqueous solution at a lower potential and its application for highly sensitive and selective detection of Cu<sup>2+</sup>. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 22(2), 155-160.
- 161 Liu, X., Jiang, H., Lei, J., & Ju, H. (2007). Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Analytical Chemistry*, 79(21), 8055-8060.
- 162 Harms, H., Wells, M. C., & Van der Meer, J. R. (2006). Whole-cell living biosensors—are they ready for environmental application. *Applied microbiology and biotechnology*, 70, 273-280.

- 
- 163 Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, 214(5092), 986-988.
- 164 Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.
- 165 Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 30(3), 489-511.
- 166 Drummond, T. G., Hill, M. G., & Barton, J. K. (2003). Electrochemical DNA sensors. *Nature biotechnology*, 21(10), 1192-1199.
- 167 Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., & Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(2), 108-117.
- 168 Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1887-1892.
- 169 Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91-100.
- 170 Homola, J. (2008). Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical reviews*, 108(2), 462-493.
- 171 Ansari, M. T. I., Raghuwanshi, S. K., & Kumar, S. (2023). Recent Advancement in Fiber-Optic-Based SPR Biosensor for Food Adulteration Detection—A Review. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 22(4), 978-988.
- 172 Deshpande, K., & Kanungo, L. (2023). Chemiluminescence and Fluorescence Biosensors for food application: A Review. *Sensors and Actuators Reports*, 5, 100137.
- 173 Qi, H., Peng, Y., Gao, Q., & Zhang, C. (2009). Applications of nanomaterials in electrogenerated chemiluminescence biosensors. *Sensors*, 9(1), 674-695.
- 174 Zhang, S., Wright, G., & Yang, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 273-282.
- 175 Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130(4), 421-426.
- 176 Wang, HB, Zhang, HD, Jiang, YL, Li, XL, and Liu, YM (2016). Determination of adenine and guanine using a glassy carbon electrode modified with dopamine-melanin nanospheres and polyaniline nanocomposites. *Analytical Letters*, 49(2), 226-235.
- 177 Sanz, V.C. (2008). Preparation of enzymatic biosensors and immunosensors based on electrodes modified with gold nanoparticles.

- 
- 178 Matharu, Z., Bandodkar, A. J., Gupta, V., & Malhotra, B. D. (2012). Fundamentals and application of ordered molecular assemblies to affinity biosensing. *Chemical Society Reviews*, 41(3), 1363-1402.
- 179 Yaakoubi, I., Mejri, A., Elfil, H., & Mars, A. (2023). Current Progress in 3D-Printed Sensors: Design, Application, and Future Challenges. *Handbook of Nanosensors: Materials and Technological Applications*, 1-32.
- 180 Gooding, J. J., Lai, L. M., & Goon, I. Y. (2009). Nanostructured electrodes with unique properties for biological and other applications. *Chemically Modified Electrodes*, 11, 1-56.
- 181 Chakraborty, A., Mitra, S., Chatterjee, M., Dey, A., & Mukherjee, S. (2024). Recent advancements in developing nanobiosensors for treating inflammatory diseases of human: a comprehensive overview. *Applications of Biotribology in Biomedical Systems*, 79-111.
- 182 Ayyar, B. V., & Arora, S. (2013). Antibody-based biosensors for detection of veterinary viral pathogens. *Adv Anim Vet Sci*, 1(4S), 37-44.
- 183 Gagni, P., Lodigiani, G., Frigerio, R., Cretich, M., Gori, A., & Bergamaschi, G. (2024). Supramolecular Hydrogels for 3D Biosensors and Bioassays. *Chemistry—A European Journal*, 30(46), e202400974.
- 184 RoyChaudhuri, C. (2015). A review on porous silicon based electrochemical biosensors: Beyond surface area enhancement factor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 210, 310-323.
- 185 Valentynovych T. (2013). The study of stability in the process of the performance of sensors and biosensors, based on conductive polymers in a strongly acid medium. *Colombian Journal of Chemical-Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 30-41.
- 186 Wang, F., & Hu, S. (2009). Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchemical Acta*, 165, 1-22.
- 187 Lizarazo, C., González, E., Arias, C., & Guarguati, J. (2018). Nanomaterials: an approach to the basics. *Medicine and Occupational Safety*, 64(251), 109-118.
- 188 Camacho, M., Vega, J., & Campos, A. (2011). Use of nanomaterials in polymers to obtain biopackaging in food applications. *Journal of the Chemical Society of Peru*, 77(4), 292-306.
- 189 Shen, W., Li, Z. & Liu, Y. (2008). Modification of surface chemical functional groups of porous carbon. *Recent Patents in Chemical Engineering*, 1(1), 27-40.

- 
- 190 Edelman, G. M. (1973). Antibody structure and molecular immunology. *Science*, 180(4088), 830-840
- 191 Boyd, W. C. (1943). *Fundamentals of immunology*.
- 192 Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S41-S52.
- 193 Di Tocco, A., Porcal, G.V., Monti, G.A., Wendel, A., Palacios, R., Fernández, H., & Arévalo, F.J. (2024). Phage conjugation with CdS nanocrystals. An alternative in the development of a new tracer for immunoassays. *Microchemical Journal* , 196 , 109634.
- 194 Huebner, J. (2004). Antibody-antigen interactions and measurements of immunological reactions. *Immunology, Infection and Immunity*, 207-232.
- 195 Urcuyo, R., González-Flores, D., & Cordero-Solano, K. (2021). Perspectives and real applications of graphene after 16 years of its discovery. *Colombian Journal of Chemistry*, 50(1), 51-85.
- 196 Li, P., Zhang, M., Sun, X., Guan, S., Zhang, G., Baumgarten, M., & Müllen, K. (2016). A highly sensitive and selective dendrimer-based fluorescence quenching sensor for Fe<sup>3+</sup> in both solution and film. *Biosensors and Bioelectronics* , 85 , 785–791.
- 197 Dutra, R. F., Mendes, R. K., da Silva, V. L., & Kubota, L. T. (2007). Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(5), 1744-1750
- 198 Lippa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 314(1-2), 1-26.
- 199 Liang, S. L., & Chan, D. W. (2007). Enzymes and related proteins as cancer biomarkers: a proteomic approach. *Clinica chimica acta*, 381(1), 93-97.
- 200 Javadpour, N., McIntire, K. R., Waldmann, T. A., Scardino, P. T., Bergman, S., & Anderson, T. (1978). The role of the radioimmunoassay of serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the intensive chemotherapy and surgery of metastatic testicular tumors. *The Journal of Urology*, 119(6), 759-762.
- 201 Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- 202 Marquette, C. A., & Blum, L. J. (2006). Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385, 546-554.
- 203 Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.

- 
- 204 Ueda, H. (2002). Open sandwich immunoassay: a novel immunoassay approach based on the interchain interaction of an antibody variable region. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(6), 614-619.
- 205 Zhang, L., Liu, Y., & Chen, T. (2008). A mediatorless and label-free amperometric immunosensor for detection of h-IgG. *International journal of biological macromolecules*, 43(2), 165-169.
- 206 Jiang, G., Li, Y., Liu, J., Liu, L., & Pi, F. (2024). Progress on aptamer-based SERS sensors for food safety and quality assessment: methodology, current applications and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(3), 783-800.
- 207 Yang, L., Gu, X., Liu, J., Wu, L., & Qin, Y. (2024). Functionalized nanomaterials-based electrochemiluminescent biosensors and their application in cancer biomarkers detection. *Talanta*, 267, 125237.
- 208 Banerjee, A., Maity, S., & Mastrangelo, C. H. (2021). Nanostructures for biosensing, with a brief overview on cancer detection, IoT, and the role of machine learning in smart biosensors. *Sensors*, 21(4), 1253.
- 209 Silvi, S., & Credi, A. (2015). Luminescent sensors based on quantum dot–molecule conjugates. *Chemical Society Reviews*, 44(13), 4275-4289.
- 210 Chen, H., Lin, L., Li, H., & Lin, J. M. (2014). Quantum dots-enhanced chemiluminescence: mechanism and application. *Coordination Chemistry Reviews*, 263, 86-100.
- 211 Martínez-Periñán, E., Gutiérrez-Sánchez, C., García-Mendiola, T., & Lorenzo, E. (2020). Electrochemiluminescence biosensors using screen-printed electrodes. *Biosensors*, 10(9), 118.
- 212 Wegner, K. D., & Hildebrandt, N. (2015). Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chemical Society Reviews*, 44(14), 4792-4834.
- 213 Algar, W. R., Stewart, M. H., Scott, A. M., Moon, W. J., & Medintz, I. L. (2014). Quantum dots as platforms for charge transfer-based biosensing: challenges and opportunities. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(45), 7816-7827.
- 214 Sapsford, K. E., Pons, T., Medintz, I. L., & Mattoussi, H. (2006). Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors*, 6(8), 925-953.
- 215 Gill, R., Zayats, M., & Willner, I. (2008). Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(40), 7602-7625.

- 
- 216 Lemon, C. M., Curtin, P. N., Somers, R. C., Greytak, A. B., Lanning, R. M., Jain, R. K., & Nocera, D. G. (2014). Metabolic tumor profiling with pH, oxygen, and glucose chemosensors on a quantum dot scaffold. *Inorganic chemistry*, 53(4), 1900-1915.
- 217 Hildebrandt, N., Wegner, K. D., & Algar, W. R. (2014). Luminescent terbium complexes: Superior Förster resonance energy transfer donors for flexible and sensitive multiplexed biosensing. *Coordination Chemistry Reviews*, 273, 125-138.
- 218 Alam, R., Karam, L. M., Doane, T. L., Zylstra, J., Fontaine, D. M., Branchini, B. R., & Maye, M. M. (2014). Near infrared bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase—quantum dot bionanoconjugates. *Nanotechnology*, 25(49), 495606.
- 219 Kumar, M., Zhang, D., Broyles, D., & Deo, S. K. (2011). A rapid, sensitive, and selective bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based nucleic acid sensing system. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 133-139.
- 220 Freeman, R., Girsh, J., & Willner, I. (2013). Nucleic acid/quantum dots (QDs) hybrid systems for optical and photoelectrochemical sensing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(8), 2815-2834.
- 221 Hu, T., Liu, X., Liu, S., Wang, Z., & Tang, Z. (2014). Toward understanding of transfer mechanism between electrochemiluminescent dyes and luminescent quantum dots. *Analytical chemistry*, 86(8), 3939-3946.
- 222 Cheng, Y., Lei, J., Chen, Y., & Ju, H. (2014). Highly selective detection of microRNA based on distance-dependent electrochemiluminescence resonance energy transfer between CdTe nanocrystals and Au nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 431-436.
- 223 Bruchez Jr, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., & Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *science*, 281(5385), 2013-2016.
- 224 Somers, R. C., Bawendi, M. G., & Nocera, D. G. (2007). CdSe nanocrystal based chem-/bio-sensors. *Chemical Society Reviews*, 36(4), 579-591.
- 225 Kateshiya, M. M. R., Desai, D. M., Malek, D. N. I., & Kailasa, S. K. Recent Progress on Ultra-Small Nanostructure Materials as Fluorescent Nanosensors for Monitoring of Various Molecules in Environmental Samples. Available at SSRN 4014077.
- 226 Chan, W. C., & Nie, S. (1998). Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281(5385), 2016-2018.

- 
- 227 Willard, D. M., Carillo, L. L., Jung, J., & Van Orden, A. (2001). CdSe– ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein– protein binding assay. *Nano Letters*, 1(9), 469-474.
- 228 Bäuml, M., Stamou, D., Segura, J. M., Hovius, R., & Vogel, H. (2004). Highly fluorescent streptavidin-coated CdSe nanoparticles: preparation in water, characterization, and micropatterning. *Langmuir*, 20(10), 3828-3831.
- 229 Chan, W. C., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., & Nie, S. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current opinion in biotechnology*, 13(1), 40-46.
- 230 Alivisatos, A. P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *science*, 271(5251), 933-937.
- 231 Reiss, P., Protiere, M., & Li, L. (2009). Core/shell semiconductor nanocrystals. *small*, 5(2), 154-168.
- 232 Green, N. M. (1990). [5] Avidin and streptavidin. In *Methods in enzymology* (Vol. 184, pp. 51-67). Academic Press.
- 233 Gitlin, G., Bayer, E. A., & Wilchek, M. (1990). Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochemical Journal*, 269(2), 527-530.
- 234 DeSilva, B., Smith, W., Weiner, R., Kelley, M., Smolec, J., Lee, B., & Celniker, A. (2003). Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharmaceutical research*, 20, 1885-1900.
- 235 Kricka, L. J. (2006). Principles of immunochemical techniques. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, 4, 219-43.
- 236 Fu, Y., Li, W., & Flarakos, J. (2019). Recommendations and best practices for calibration curves in quantitative LC–MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 11(15), 1375-1377.
- 237 Miller, J. N., & Miller, J. C. (1998). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Signal, 100,95.
- 238 Azadeh, M., Gorovits, B., Kamerud, J., MacMannis, S., Safavi, A., Sailstad, J., & Sondag, P. (2018). Calibration curves in quantitative ligand binding assays: recommendations and best practices for preparation, design, and editing of calibration curves. *The AAPS journal*, 20, 1-16.
- 239 Findlay, J. W., & Dillard, R. F. (2007). Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS journal*, 9, E260-E267.

- 
- 240 Gottschalk, P. G., & Dunn, J. R. (2005). The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Analytical biochemistry*, 343(1), 54-65.
- 241 Balaji Viswanath, K., Suganya, K., Krishnamoorthy, G., Marudhamuthu, M., Tamil Selvan, S., & Vasantha, V. S. (2021). Enzyme-free multiplex detection of foodborne pathogens using au nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes. *ACS Food Science & Technology*, 1(7), 1236-1246.
- 242 Proll, G., & Ehni, M. (2014). Immunoassays. *Handbook of Spectroscopy: Second, Enlarged Edition*, 1313-1334.
- 243 Robison-Cox, J. F. (1995). Multiple estimation of concentrations in immunoassay using logistic models. *Journal of immunological methods*, 186(1), 79-88.
- 244 Roberts, L., Griffith, T., Champneys, A., Piano, M., Kiely, J., & Luxton, R. (2017). Mathematical modelling of a magnetic immunoassay. *IMA Journal of Applied Mathematics*, 82(6), 1253-1282.
- 245 Long, G. L., & Winefordner, J. D. (1983). Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical chemistry*, 55(7), 712A-724A.
- 246 Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*, 67(10), 1699-1723.
- 247 Rusling, J. F., & Suib, S. L. (1994). Characterizing materials with cyclic voltammetry. *Advanced Materials*, 6(12), 922-930.
- 248 Heinze, J. (1984). Cyclic voltammetry— “electrochemical spectroscopy”. *New analytical methods* (25). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 23(11), 831-847.
- 249 Inzelt, G. (2010). Chronocoulometry. *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, 147-158.
- 250 Pratt, K. W. (1984). Chronoamperometric determination of diffusion-layer thicknesses at hydrodynamic electrodes. *Analytical Chemistry*, 56(11), 1967-1970.
- 251 Nirmaier, H. P., & Henze, G. (1997). Characteristic behavior of macro-, semimicro- and microelectrodes in voltammetric and chronoamperometric measurements. *Electroanalysis*, 9(8), 619-624.
- 252 Hayat, A., Catanante, G., & Marty, J. L. (2014). Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors*, 14(12), 23439-23461.

- 
- 253 Tauc, J. (1968). Optical properties and electronic structure of amorphous Ge and Si. *Materials research bulletin*, 3(1), 37-46.
- 254 Huang, Y. Q.; Beyer, J.; Puttisong, Y.; Buyanova, I. A.; Chen, W. M. (2021). Identifying a Generic and Detrimental Role of Fano Resonance in Spin Generation in Semiconductor Nanostructures. *Physical Review Letters*, 127(12), 127401.
- 255 Ortega-López, M.; Morales-Acevedo, A. (2000). Study of the physical properties of polycrystalline CdO films deposited by chemical bath. vol, 42, 776-789.
- 256 Dick, J. E., Poirel, A., Ziessel, R., & Bard, A. J. (2015). Electrochemistry, electrogenerated chemiluminescence, and electropolymerization of oligothieryl-BODIPY derivatives. *Electrochimica Acta*, 178, 234-239.
- 257 Rafiee, M., Abrams, D. J., Cardinale, L., Goss, Z., Romero-Arenas, A., & Stahl, S. S. (2024). Cyclic voltammetry and chronoamperometry: mechanistic tools for organic electrosynthesis. *Chemical Society Reviews*, 53(2), 566-585.
- 258 Bard, A. J. (Ed.). (2004). *Electrogenerated chemiluminescence*. CrC Press.
- 259 Sánchez, C., Enríquez, R., López, H., & Velázquez, M. (2018). Chronoamperometric study of the transfer of triazines through the interface of two immiscible electrolyte solutions. *I will engineer. Chilean Engineering Magazine*, 26(4), 585-592.
- 260 Dong, F., Wu, L., Sun, Y., Fu, M., Wu, Z., & Lee, S. C. (2011). Efficient synthesis of polymeric gC 3 N 4 layered materials as novel efficient visible light driven photocatalysts. *Journal of Materials Chemistry*, 21(39), 15171-15174.
- 261 Sharma, P., Sarngan, P. P., Lakshmanan, A., & Sarkar, D. (2021). One-step synthesis of highly reactive gC 3 N 4. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 1-10.
- 262 Guru, S., & Rao, G. R. (2022). Strategic design of layered double hydroxides and graphitic carbon nitride heterostructures for photoelectrocatalytic water splitting applications. *Journal of The Electrochemical Society*, 169(4), 046515.
- 263 Tong, J., Zhang, L., Li, F., Wang, K., Han, L., & Cao, S. (2015). Rapid and high-yield production of gC 3 N 4 nanosheets via chemical exfoliation for photocatalytic H 2 evolution. *RSC advances*, 5(107), 88149-88153.
- 264 Guan, D., Li, P., Cui, Y., Zhang, Q., & Zhang, W. (2011). A competitive immunoassay with a surrogate calibration curve for aflatoxin M1 in milk. *Analytica chimica acta*, 703 (1), 64-69.
- 265 CHU, FS, Steinert, BW and Gaur, PK (1985). Production and characterization of antibodies against aflatoxin G1. *Journal of Food Safety*, 7 (3), 161-170.

- 
- 266 Jiang, W., Mardyani, S., Fischer, H., & Chan, W. C. (2006). Design and characterization of lysine cross-linked mercapto-acid biocompatible quantum dots. *Chemistry of Materials*, 18(4), 872-878.
- 267 Zhou, J., Yang, Y., and Zhang, C.Y. (2015). Toward biocompatible semiconductor quantum dots: from biosynthesis and bioconjugation to biomedical application. *Chemical reviews*, 115 (21), 11669-11717.
- 268 Jiang, W., Mardyani, S., Fischer, H., and Chan, W. C. (2006). Design and characterization of biocompatible quantum dots containing lysine-crosslinked mercaptoacids. *Chemistry of Materials*, 18 (4), 872-878.
- 269 Nash, M. A., Waitumbi, J. N., Hoffman, A. S., & Yager, P. (2007). New developments in the formation of imine bonds for the covalent immobilization of proteins on solid supports. *Analytical Chemistry*, 79(12), 4540-4545.
- 270 Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., & Mattoussi, H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nature materials*, 4 (6), 435-446.
- 271 Al-Obaidi, Z. M. J., Al Ani, A. A. E., Al-Juhaishi, A. M. R., & Hussein, A. N. (2019). A comparative study for the quantification of paracetamol in multicomponent oral solution employing standard addition method utilized in UV-Visible spectroscopy and RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(2), 339-342.
- 272 Ngo, C. Y., Yoon, S. F., Fan, W. J., & Chua, S. J. (2006). Effects of size and shape on electronic states of quantum dots. *Physical Review B—Condensed Matter and Materials Physics*, 74(24), 245331.
- 273 Kaniyankandy, S., Rawalekar, S., Verma, S., Palit, D. K., & Ghosh, H. N. (2010). Charge carrier dynamics in thiol capped CdTe quantum dots. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(16), 4210-4216.
- 274 Zhang, J., Wang, Y., Jin, J., Zhang, J., Lin, Z., Huang, F., & Yu, J. (2013). Efficient visible-light photocatalytic hydrogen evolution and enhanced photostability of core/shell CdS/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanowires. *ACS applied materials & interfaces*, 5(20), 10317-10324.
- 275 Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E. (1990). The quantum mechanics of larger semiconductor clusters (“quantum dots”). *Annu. Rev. Phys. Chem*, 41(1), 477-496.
- 276 Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. (2003). Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 15(14), 2854-2860.
- 277 Santos, C. I. D. L., Carvalho, M. S., Raphael, E., Dantas, C., Ferrari, J. L., & Schiavon, M. A. (2016). Synthesis, optical characterization, and size distribution

---

determination by curve resolution methods of water-soluble CdSe quantum dots. *Materials Research*, 19(6), 1407-1416.

278 Hines, M. A., & Guyot-Sionnest, P. (1996). Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(2), 468-471.

279 Aldeek, F., Balan, L., Lambert, J., & Schneider, R. (2008). The influence of capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots. *Nanotechnology*, 19(47), 475401.

280 Brus, L. E. (1984). Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *The Journal of chemical physics*, 80(9), 4403-4409.

281 Jeong, D. W., Park, T. H., Lee, J. H., & Jang, D. J. (2021). Efficient addition of desired carboxylate ligands to CdSe quantum dots passivated with phosphonic acids. *The Journal of Physical Chemistry C*, 125(41), 22929-22936.

282 Rogach, A. L., Franzl, T., Klar, T. A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., & Donegan, J. F. (2007). Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40), 14628-14637.

283 Schöps, O., Le Thomas, N., Woggon, U., & Artemyev, M. V. (2006). Recombination dynamics of CdTe/CdS core-shell nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(5), 2074-2079.

284 Li, L., Chen, Y., Lu, Q., Ji, J., Shen, Y., Xu, M., & Zhu, J. J. (2013). Electrochemiluminescence energy transfer-promoted ultrasensitive immunoassay using near-infrared-emitting CdSeTe/CdS/ZnS quantum dots and gold nanorods. *Scientific reports*, 3(1), 1529.

285 Verma, S., Kaniyankandy, S., & Ghosh, H. N. (2013). Charge separation by indirect bandgap transitions in CdS/ZnSe type-II core/shell quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(21), 10901-10908.

286 Singh, A., Yumnam, S., Kunwar, A., Tripathi, V. S., Neogy, S., & Rath, M. C. (2020). One-Pot, Rapid and Facile Synthesis of Thioglycolic Acid capped CdSe quantum dots: Tuning of Properties, Mechanistic Investigations by Cyclic Voltammetry and Cytotoxicity Studies. *ChemistrySelect*, 5(26), 7743-7752.

287 Shishlov, N. M., & Khursan, S. L. (2016). Effect of ion interactions on the IR spectrum of benzenesulfonate ion. Restoration of sulfonate ion symmetry in sodium benzenesulfonate dimer. *Journal of Molecular Structure*, 1123, 360-366.

- 
- 288 J.P. Misiewicz, K.B. Moore, P.R. Franke, W.J. Morgan, J.M. Turney, G.E. Doublerly, H.F. Schaefer, Sulfurous and sulfonic acids: predicting the infrared spectrum and setting the surface straight, *J. Chem. Phys.* 152 (2020) 024302.
- 289 Bard, A. J., Ding, Z., & Myung, N. (2005). Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence of semiconductor nanocrystals in solutions and in films. *Semiconductor Nanocrystals and Silicate Nanoparticles*, 1-57.
- 290 Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S., & Credi, A. (2012). Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots. *Chemical Society Reviews*, 41(17), 5728-5743.
- 291 Bao, L., Sun, L., Zhang, Z. L., Jiang, P., Wise, F. W., Abruña, H. D., & Pang, D. W. (2011). Energy-level-related response of cathodic electrogenerated-chemiluminescence of self-assembled CdSe/ZnS quantum dot films. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(38), 18822-18828.
- 292 Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S., & Credi, A. (2012). Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots. *Chemical Society Reviews*, 41(17), 5728-5743.
- 293 Myung, N.; Ding, Z.; Bard, A. J. (2002). Electrogenerated chemiluminescence of CdSe nanocrystals. *Nano Letters*, 2(11), 1315-1319.
- 294 Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2017). Review of Sample Treatments and the State-of-the-art of Analytical Techniques for Mycotoxins in Food. *Analysis of Food Toxins and Toxicants*, 51-102.
- 295 Sharma, A., Varshney, M., Chae, K., & Won, S. (2018). Mechanistic investigations on the emission characteristics of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@ Pt and g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@Ag nanostructures using X-ray absorption spectroscopy. *Current Applied Physics*, 18(11), 1458-1464.
- 296 Sharma, A., Varshney, M., Chae, K., & Won, S. (2018). Mechanistic investigations on the emission characteristics of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@ Pt and g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@Ag nanostructures using X-ray absorption spectroscopy. *Current Applied Physics*, 18(11), 1458-1464.
- 297 Kang, Y., Yang, Y., Yin, L. C., Kang, X., Wang, L., Liu, G., & Cheng, H. M. (2016). Selective Breaking of Hydrogen Bonds of Layered Carbon Nitride for Visible Light Photocatalysis. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 28(30), 6471-6477.
- 298 Jones, G. A., & Bradshaw, D. S. (2019). Resonance energy transfer: from fundamental theory to recent applications. *Frontiers in Physics*, 7, 100.
- 299 Zhang, P., Zhang, S., Wan, D., Zhang, P., Zhang, Z., & Shao, G. (2020). Multilevel polarization-fields enhanced capture and photocatalytic conversion of particulate matter

---

over flexible schottky-junction nanofiber membranes. *Journal of hazardous materials*, 395, 122639.

300 Ran, J., Ma, T. Y., Gao, G., Du, X. W., & Qiao, S. Z. (2015). Porous P-doped graphitic carbon nitride nanosheets for synergistically enhanced visible-light photocatalytic H<sub>2</sub> production. *Energy & Environmental Science*, 8(12), 3708-3717.

301 She, X., Xu, H., Xu, Y., Yan, J., Xia, J., Xu, L., & Li, H. (2014). Exfoliated graphene-like carbon nitride in organic solvents: enhanced photocatalytic activity and highly selective and sensitive sensor for the detection of trace amounts of Cu<sup>2+</sup>. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(8), 2563-2570.

302 Abuelela, A. M., Mohamed, T. A., & Prezhdo, O. V. (2012). DFT simulation and vibrational analysis of the IR and Raman spectra of a CdSe quantum dot capped by methylamine and trimethylphosphine oxide ligands. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(27), 14674-14681.

303 Huo, Y., Zhang, J., Dai, K., & Liang, C. (2021). Amine-modified S-scheme porous g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/CdSe–diethylenetriamine composite with enhanced photocatalytic CO<sub>2</sub> reduction activity. *ACS Applied Energy Materials*, 4(1), 956-968.

304 Zhang, J., Chen, X., Takanabe, K., Maeda, K., Domen, K., Epping, J. D., & Wang, X. (2009). Synthesis of a carbon nitride structure for visible-light catalysis by copolymerization. *Angewandte Chemie*, 2(122), 451-454.

305 Gong, Y., Zhao, X., Zhang, H., Yang, B., Xiao, K., Guo, T., and Yu, G. (2018). MOF-derived nitrogen-doped carbon-modified g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> heterostructural composite with enhanced photocatalytic activity for the degradation of bisphenol A with peroxymonosulfate under visible light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 233, 35–45.

306 Admassie, S., Inganäs, O., Mammo, W., Perzon, E., & Andersson, M. R. (2006). Electrochemical and optical studies of the band gaps of alternating polyfluorene copolymers. *Synthetic metals*, 156(7-8), 614-623.

307 Gupta, N., Todi, K., Narayan, T., & Malhotra, B.D. (2022). Graphitic carbon nitride-based nanoplatfoms for biosensors: Design strategies and applications. *Materials Today Chemistry*, 24, 100770.

308 Richter, M. M. (2004). Electrochemiluminescence (ecl). *Chemical Reviews*, 104(6), 3003-3036.

309 Chuanshuai Li, Xianshao Zou, Weihua Lin, Hassan Mourad, Jie Meng, Yang Liu, Mohamed Abdellah, Meiyuan Guo, Kaibo Zheng, & Ebbe Nordlander (2021). Graphitic

---

Carbon Nitride/CdSe Quantum Dot/Iron Carbonyl Cluster Composite for Enhanced Photocatalytic Hydrogen Evolution ACS Appl. Nano Mater., 4, 6280–6289.

310 Yong Liu, Kai Yan, and Jingdong Zhang (2016). Graphitic Carbon Nitride Sensitized with CdS Quantum Dots for Visible-Light-Driven Photoelectrochemical Aptasensing of Tetracycline, ACS Appl. Mater. Interfaces, 8, 42, 28255–28264.

311 Li, Y., Zhou, M., Cheng, B., & Shao, Y. (2020). Recent advances in g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-based heterojunction photocatalysts. Journal of Materials Science & Technology, 56, 1-17.

312 Cao, S. W., Yuan, Y. P., Fang, J., Shahjamali, M. M., Boey, F. Y., Barber, J., & Xue, C. (2013). In-situ growth of CdS quantum dots on g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets for highly efficient photocatalytic hydrogen generation under visible light irradiation. International Journal of Hydrogen Energy, 38(3), 1258-1266.

313 Vuong, H. T., Nguyen, D. V., Ly, P. P., Phan, P. D. M., Nguyen, T. D., Tran, D. D., & Hieu, N. H. (2022). Defect engineering of porous g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> to add multifunctional groups for enhanced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via piezo-photocatalysis. ACS Applied Nano Materials, 6(1), 664-676.

314 Kanoufi, F., Zu, Y., & Bard, A. J. (2001). Homogeneous oxidation of trialkylamines by metal complexes and its impact on the electrogenerated chemiluminescence in the trialkylamine/Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> system. The Journal of Physical Chemistry B, 105 (1), 210-216.

315 Cao, Z., Li, C., Shu, Y., Zhu, M., Su, B., Qin, H., & Peng, X. (2023). Uncovering mechanisms of highly efficient but stable electrochemiluminescence from quantum dots. Journal of the American Chemical Society, 145 (48), 26425-26434.

316 Daviddi, E., Oleinick, A., Svir, I., Valenti, G., Paolucci, F., & Amatore, C. (2017). Theory and Simulation for Optimizing Electrogenerated Chemiluminescence from Tris (2, 2'-bipyridine) -ruthenium (II)-Doped Silica Nanoparticles and Tripropylamine. ChemElectroChem, 4 (7), 1719-1730.

317 Miao, W., Choi, J. P., & Bard, A. J. (2002). Electrogenerated Chemiluminescence: The Tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II), (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)/Tri-n-propylamine (TPrA) system revisited A new pathway involving TPrA<sup>•+</sup> cationic radicals. Journal of the American Chemical Society, 124 (48), 14478-14485.

318 Liu, Y., Wang, Q., Lei, J., Hao, Q., Wang, W., & Ju, H. (2014). Anodic electrochemiluminescence of graphitic-phase C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets for sensitive biosensing. Talanta, 122, 130-134.

- 
- 319 Dai, C., Gan, Y., Qin, J., Ma, L., Liu, Q., Huang, L., & Zhu, S. (2023). An ultrasensitive solid-state ECL biosensor based on synergistic effect between Zn-NGQDs and porphyrin-based MOF as “on-off-on” platform. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 226, 113322.
- 320 Takahashi, F., & Jin, J. (2009). Rapid determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and total vitamin C by electrochemiluminescence with a thin-layer electrochemical cell. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393, 1669-1675.
- 321 Kwon, H. J., Rivera, E. C., Neto, M. R., Marsh, D., Swerdlow, J. J., Summerscales, R. L., & Uppala, P. P. T. (2020). Development of smartphone-based ECL sensor for dopamine detection: Practical approaches. *Results in Chemistry*, 2, 100029.
- 322 Liu, Y., Sun, G., Jiang, C., Zheng, X. T., Zheng, L., & Li, C. M. (2014). Highly sensitive detection of hydrogen peroxide at a carbon nanotube fiber microelectrode coated with palladium nanoparticles. *Microchimica Acta*, 181, 63-70.
- 323 Wang, J., Sun, H. B., Pan, H. Y., Ding, Y. Y., Wan, J. G., Wang, G. H., & Han, M. (2016). Detection of hydrogen peroxide at a palladium nanoparticle-bilayer graphene hybrid-modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 230, 690-696.
- 324 Zhou, T., Yao, Q., Zhao, T., & Chen, X. (2015). One-pot synthesis of fluorescent DHLA-stabilized Cu nanoclusters for the determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Talanta*, 141, 80-85.
- 325 H.-C. Chang, J.-a.A. Ho, Gold Nanocluster-Assisted Fluorescent Detection for Hydrogen Peroxide and Cholesterol Based on the Inner Filter Effect of Gold Nanoparticles, *Analytical chemistry*, 87(2015) 10362-7.
- 326 X. Hu, X. Liu, X. Zhang, H. Chai, Y. Huang, One-pot synthesis of the CuNCs/ZIF-8 nanocomposites for sensitively detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and screening of oxidase activity, *Biosensors and Bioelectronics*, 105(2018) 65-70.
- 327 H. Chen, A. Fang, L. He, Y. Zhang, S. Yao, Sensitive fluorescent detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose in human serum based on inner filter effect of squaric acid-iron (III) on the fluorescence of upconversion nanoparticle, *Talanta*, 164(2017) 580-7.
- 328 Y. Wang, M. Yang, Y. Ren, J. Fan, Ratiometric determination of hydrogen peroxide based on the size-dependent green and red fluorescence of CdTe quantum dots capped with 3-mercaptopropionic acid, *Microchimica Acta*, 186(2019) 277.
- 329 Z. Zhou, L. Yang, L. Huang, Y. Liao, Y. Liu, Q. Xiao, A novel fluorescent probe for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection based on CdSe@ZnS quantum dots/Ag nanocluster hybrid, *Analytica Chimica Acta*, 1106(2020) 176-82.

- 
- 330 K. Atacan, M. Özacar, Construction of a non-enzymatic electrochemical sensor based on CuO/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> composite for selective detection of hydrogen peroxide, *Materials Chemistry and Physics*, 266(2021) 124527.
- 331 D. Zhang, H. Zhao, Z. Fan, M. Li, P. Du, C. Liu, et al., A Highly Sensitive and Selective Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Gold Nanoparticles and Three-Dimensional Porous Carbonized Chicken Eggshell Membrane, *PLOS ONE*, 10(2015) e0130156.
- 332 Nieto, C. H. D., Granero, A. M., Zon, M. A., & Fernández, H. (2018). Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460-470.
- 333 Steyn, PS, Thiel, PG, & Trinder, DW (1991). Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. *Mycotoxins and foods of animal origin*. Smith JE & Henderson RS, (Eds.) CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 165-221.
- 334 Maness, D.D., Schneider, L.W., Sullivan, G., Yakatan, G.J., & Scholler, J. (1976). Fluorescence behavior of sterigmatocystin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (5), 961-963.
- 335 Hruska, Z., Yao, H., Kincaid, R., Brown, R., Cleveland, T., & Bhatnagar, D. (2014). Fluorescence excitation-emission characteristics of aflatoxin and related secondary metabolites and their application for rapid detection of mycotoxins. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1195–1201.
- 336 Maness, D. D., Schneider, L. W., Sullivan, G., Yakatan, G. J., & Scholler, J. (1976). Fluorescence behavior of sterigmatocystin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(5), 961-963.
- 337 R.M. Silverstein, G.C. Bassler, *Spectrometric identification of organic compounds*, *Journal of Chemical Education*, 39(1962) 546.
- 338 Sánchez, C., Enríquez, R., López, H., & Velázquez, M. (2018). Chronoamperometric study of the transfer of triazines through the interface of two immiscible electrolyte solutions. *I will engineer. Chilean Engineering Magazine*, 26(4), 585-592.
- 339 Chen, Y. A., Shie, M. Y., Ho, C. C., Ye, S. W., Chen, I. W. P., Shih, Y. Y., & Chen, Y. W. (2023). A novel label-free electrochemical immunosensor for the detection of heat shock protein 70 of lung adenocarcinoma cell line following paclitaxel treatment using l-cysteine-functionalized Au@ MnO<sub>2</sub>/MoO<sub>3</sub> nanocomposites. *RSC advances*, 13(43), 29847-29861.

- 
- 340 Bhardwaj, H., Hashmi, Z., Singh, A. K., Kumar, G., Lakshmi, G. B. V. S., & Solanki, P. R. (2025). An electrochemical immunosensor based on a nano-ceria integrated microfluidic chip for interleukin-8 biomarker detection. *Nanoscale Advances*, 7(1), 196-208.
- 341 Hock, B. (1997). Antibodies for immunosensors a review. *Analytica Chimica Acta*, 347(1-2), 177-186.
- 342 Pasinszki, T., Krebsz, M., Tung, T. T., & Losic, D. (2017). Carbon nanomaterial-based biosensors for non-invasive detection of cancer and disease biomarkers for clinical diagnosis. *Sensors*, 17(8), 1919.
- 343 Balcer, H. I., Spiker, J. O., & Kang, K. A. (2003). Effects of blocking buffers and plasma proteins on the protein C biosensor performance. *Oxygen Transport to Tissue XXIV*, 133-141.
- 344 Liu, J., Chen, M., Zhang, Z. L., Hong, X., Yu, Z. L., & Tian, Z. Q. (2023). NIR quantum dot construction of a fluorescence anisotropy signal amplification biosensor for sensitive, rapid and separation-free detection of dopamine in serum. *Analyst*, 148(15), 3543-3550.
- 345 Etgar, L. (2013). Semiconductor nanocrystals as light harvesters in solar cells. *Materials*, 6(2), 445-459.
- 346 Kamat, P. V. (2008). Quantum dot solar cells. Semiconductor nanocrystals as light harvesters. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(48), 18737-18753.
- 347 Daniel, W. W., & Cross, C. L. (2018). *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. John Wiley & Sons.
- 348 Sun, C., Liao, X., Huang, P., Shan, G., Ma, X., Fu, L., & Kong, W. (2020). A self-assembled electrochemical immunosensor for ultra-sensitive detection of ochratoxin A in medicinal and edible malt. *Food Chemistry*, 315, 126289.
- 349 Nieto, C. D., Granero, A. M., Garcia, D., Nesci, A., Barros, G., Zon, M. A., & Fernández, H. (2019). Development of a third-generation biosensor to determine sterigmatocystin mycotoxin: An early warning system to detect aflatoxin B1. *Talanta*, 194, 253-258.
- 350 Matabaro, E., Ishimwe, N., Uwimbabazi, E., & Lee, B. H. (2017). Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(5), 808-820.

- 
- 351 Zhao, Y., Huang, J., Ma, L., Liu, S., & Wang, F. (2017). Aflatoxin B1 and sterigmatocystin survey in beer sold in China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10(1), 64-68.
- 352 Singh, G., Velasquez, L., Huet, A. C., Delahaut, P., Gillard, N., & Koerner, T. (2019). Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for determination of sterigmatocystin in wheat and corn flours. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(2), 327-335.
- 353 Veršilovskis, A., Bartkevičs, V., & Miķelsone, V. (2007). Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. *Journal of chromatography A*, 1157(1-2), 467-471.
- 354 Xu, L., Fang, G., Pan, M., Wang, X., & Wang, S. (2016). One-pot synthesis of carbon dots-embedded molecularly imprinted polymer for specific recognition of sterigmatocystin in grains. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 950-956.
- 355 World Health Organization. (1993). Sampling plans for afltoxin analysis in peanuts and corn. FAO. Food and Nutrition Paper, (55).
- 356 MILK, M. D. A. A. E., & CORN, M. Y. Decree No. 155/006-MERCOSUR. Technical Regulation on maximum admissible aflatoxin limits in milk, peanuts, and corn. This regulation is hereby declared applicable to domestic law.
- 357 THE SECRETARY, D. P., & SANITARIAS, R. Y. R. Argentina, Plant and Animal Health, Phytosanitary Products.
- 358 Marleny Coromoto, C., Mazzani Cardinalis, C. B., Luzón, O., & Garrido, M. J. (2012). Detection of toxigenic fungi in precooked corn flours distributed in Aragua state, Venezuela. *Journal of the Venezuelan Society of Microbiology*, 32(2), 126-130.
- 359 Schuller, P. L., Horwitz, W., & Stoloff, L. (1976). A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analysis for aflatoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 59(6), 1315-1343.
- 360 Zenkevich, I. G., Kochetova, M. V., Larionov, O. G., Revina, A. A., & Kosman, V. M. (2005). Retention Indices as the Most Reproducible Retention Parameters in Reversed Phase HPLC. Calculation for Hydrophilic Phenolic Compounds Using Reference n-Alkyl Phenyl Ketones. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 28(14), 2141-2162.

---

361 Veršilovskis, A., De Saeger, S., & Mikelsone, V. (2008). Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World mycotoxin journal*, 1(2), 161-166.

